

3.2 Etablierung des RISC *in vitro* Assays

Im Effektorschritt wird die im Initiationsschritt prozessierte siRNA zunächst in den Multienzymkomplex RISC inkorporiert. Nach dem Entwinden bleibt einer der beiden siRNA-Stränge mit dem RISC assoziiert und mediert über komplementäre Basenpaarungen die Erkennung der Ziel-mRNA (68,81). Nach der Hybridisierung wird die mRNA endonukleolytisch durch die RISC-Komponente Slicer gespalten. Die Position der mRNA-Hydrolyse korrespondiert dabei mit der zentralen Position der siRNA (19,21,38).

Die Erkenntnisse über den RNAi-Effektorschritt stammen vornehmlich aus *in vitro* Assays, die die siRNA-medierte Spaltung von homologer mRNA in *Drosophila*-Zellextrakten rekapitulieren (19,38,69). Dagegen ist für Trypanosomen wenig über den Effektorschritt bekannt, da ein vergleichbares *in vitro* System fehlt. Die folgenden Experimente zeigen die Etablierung und Charakterisierung eines RISC *in vitro* Assays (RIVA) für *Trypanosoma brucei*.

3.2.1 Transfektion synthetischer siRNAs in Trypanosomen

In höheren Eukaryoten kann ein transienter RNAi-Effekt durch die Transfektion synthetischer siRNAs induziert werden. Dabei fällt auf, dass verschiedene siRNAs, die von einer mRNA Sequenz abgeleitet wurden, unterschiedliche *knock down* Effizienzen aufweisen (2). siRNAs, die mit hoher Effizienz die sequenzspezifische mRNA-Degradation medieren, werden als funktionelle siRNAs bezeichnet. Diese Beobachtung spielt eine wichtige Rolle bei der Etablierung eines RISC *in vitro* Assays, da die Detektion einer RISC-Aktivität von dem Einsatz funktioneller siRNAs abhängt. Die nächsten drei Abschnitte beschäftigen sich daher mit den folgenden Fragen:

- Welche Sequenzen sollen für die Synthese funktioneller siRNAs verwendet werden (Abschnitt 3.2.1.1)?
- Gibt es neben der chemischen Synthese eine alternative Möglichkeit zur Herstellung von siRNAs (Abschnitt 3.2.1.2)?
- Wie kann die Effizienz der siRNA in Trypanosomen getestet werden (Abschnitt 3.2.1.3)?

3.2.1.1 Kriterien für die Sequenzauswahl funktioneller siRNAs

Obwohl die Transfektion von dsRNA eine effiziente RNAi-Technik in Trypanosomen darstellt (12), sind vergleichbare Versuche mit synthetischen siRNAs bisher nicht etabliert worden. Unter Berücksichtigungen der strukturellen Untersuchungen in Abschnitt 3.1.3 sollten daher verschiedene siRNAs transfiziert und deren *knock down* Effizienz anhand eines geeigneten Reportergens bestimmt werden. In Trypanosomen eignet sich α -Tubulin als Reporter für RNAi. Bei der Elektroporation von homologer dsRNA (113 bp) konnte gezeigt werden, dass der *knock down* zu einer charakteristischen Abrundung der ansonsten länglichen Trypanosomen führt. Diese Zellmorphologie wird als FAT-Phänotyp bezeichnet (12).

Für die Sequenzauswahl der siRNAs innerhalb des α -Tubulin-Gens wurden vergleichende Analysen von funktionellen und nicht-funktionellen siRNAs aus höheren Eukaryoten berücksichtigt [Abschnitt 1.3.2 und (2,75)]. In diesen wurden die Stabilitäten innerhalb der basengepaarten Bereiche von siRNAs berechnet. Dazu wurde von allen pentameren Subsequenzen der siRNAs die internen thermodynamischen (IT-) Stabilitäten nach folgender Formel bestimmt:

$$\Delta G(i) = \sum_{n=i}^{i+3} \Delta G(X_n, Y_{n+1})$$

Formel 3. Berechnung der IT-Stabilität ΔG einer pentameren Subsequenz in einer siRNA nach der *nearest neighbor* Methode (2,114). Dabei wird ausgehend vom 5'-Ende des siRNA *sense*-Stranges der ΔG -Wert für die *i*-te Position berechnet. $\Delta G(X_n, Y_{n+1})$ bezeichnet die freie Energie für die benachbarten, basengepaarten Nukleotide X und Y an der Position *n* und *n*+1. Die verwendeten ΔG -Werte und eine exemplarische Berechnung können aus der Abbildung 16B, D entnommen werden.

In Abbildung 16A sind IT-Profile dargestellt, die von Khvorova *et al.* (2003) aus den positionsspezifischen Mittelwerten von 180 verschiedenen siRNAs errechnet wurden. Bei dem Vergleich von funktionellen und nicht-funktionellen siRNAs zeigen sich vor allem Unterschiede in den terminalen Regionen des doppelsträngigen Bereiches. Funktionelle siRNAs besitzen in den IT-Profilen eine höhere Stabilität am 5'-Ende als am 3'-Ende (hierbei wird sich stets auf den *sense*-Strang bezogen). Dieses Verhältnis ist für nicht-funktionelle siRNAs umgekehrt. Darüber hinaus fällt auf, dass

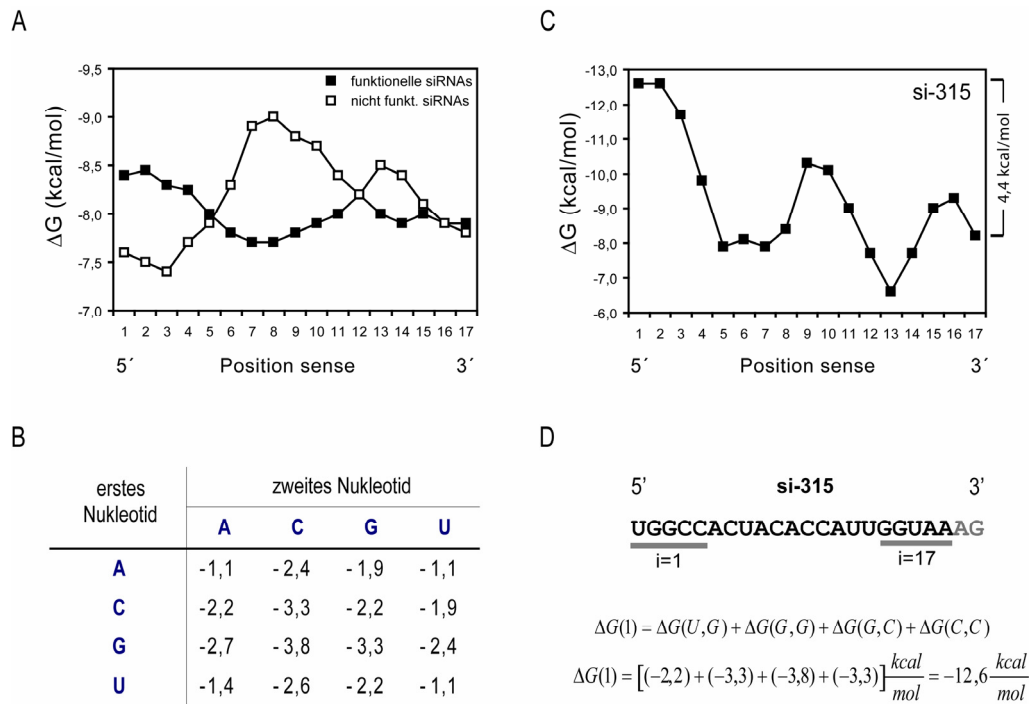


Abbildung 16. Interne thermodynamische Stabilitätsprofile von siRNA-Molekülen – A. Profil der berechneten Mittelwerte für die IT-Stabilitäten von 180 verschiedenen siRNAs (entnommen und modifiziert nach Khvorova *et al.*, 2003). Die siRNAs wurden für die Gene Luziferase und Cyclophilin in menschlichen Zelllinien getestet (2). Für die Berechnungen wurden 53 Sequenzen funktioneller siRNAs (■) und 41 Sequenzen nicht-funktioneller siRNAs (□) berücksichtigt. **B.** Die Tabelle zeigt die Werte der freien Energie (ΔG) für jede mögliche Kombination an basengepaarten Nukleotiddimeren (2). Für die Berechnung der IT-Stabilität für jede pentamere Subsequenz wurden diese Werte als $\Delta G(X_i, Y_{i+1})$ in die Formel 3 eingesetzt. **C.** Berechnung des IT-Stabilitätsprofils von si315. Auf der rechten Seite des Graphen ist die Differenz der Werte $\Delta G(17)$ und $\Delta G(1)$ dargestellt. Der angegebene Wert von 4,4 kcal/mol entspricht der Differenz der berechneten ΔG -Werte des 3'- und des 5'-Endes der siRNA. **D.** Die Sequenz des siRNA *sense*-Stranges wurde für si315 angegeben. Die grauen Nukleotide korrespondieren mit einzelsträngigen Bereichen der siRNA. Graue Balken markieren die pentamere Subsequenz für die Positionen 1 und 17. Darunter ist die exemplarische Berechnung der IT-Stabilität der pentameren Subsequenz von si315 an Position 1 gezeigt. Die Werte für $\Delta G(X_i, Y_{i+1})$ wurden aus der Tabelle in B entnommen.

der zentrale Bereich funktioneller siRNAs eine verminderte Stabilität besitzt. Für die Transfektion in *T. brucei* wurde eine siRNA-Sequenz innerhalb des α -Tubulin Gens gesucht, die ein IT-Profil funktioneller siRNAs aufweist. Abbildung 16C zeigt das entsprechende Profil für siRNA si315, bei der der berechnete ΔG -Wert des 5'-Endes um 4,4 kcal/mol niedriger liegt als der des 3'-Endes. Zwei weitere Sequenzen wurden aus dem α -Tubulin Gen ausgewählt (Abbildung 17). Dabei besitzt si956 ebenfalls das IT-Profil einer funktionellen siRNA, jedoch ist die Differenz zwischen den ΔG -Werten des 5'- und des 3'-Endes mit 2,4 kcal/mol geringer als für si315. Als Negativkontrolle

wurde eine Sequenz ausgewählt (si329), deren IT-Profil einer nicht-funktionellen siRNA entspricht. Dabei ist der berechnete ΔG -Wert für das 5'-Ende um 1,6 kcal/mol größer als der des 3'-Endes.

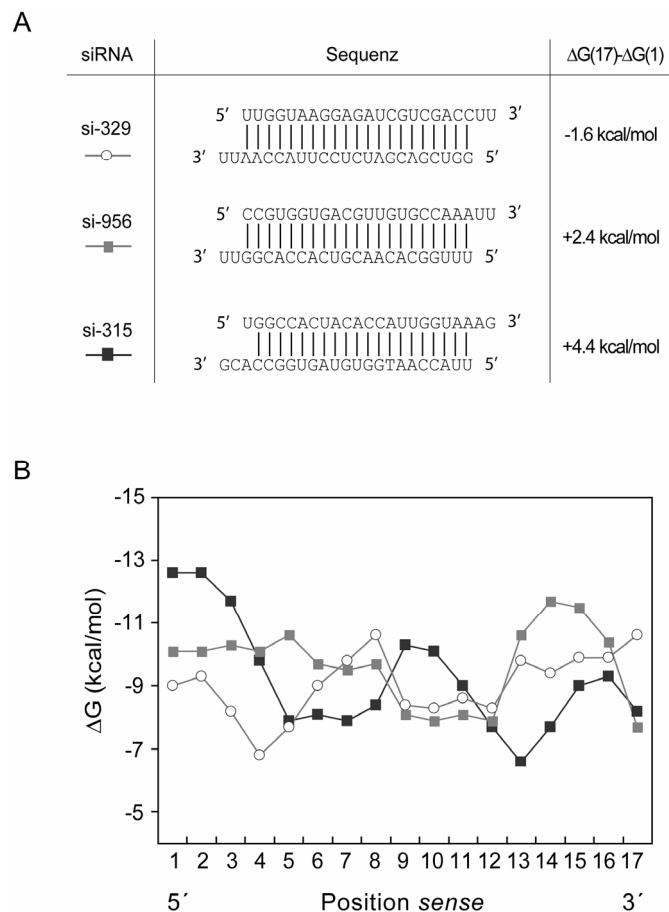


Abbildung 17. Sequenzen und IT-Stabilitätsprofile der transfizierten siRNAs – A. In der Tabelle sind die Sequenzen der synthetisierten siRNAs abgebildet und die Differenzen der IT-Stabilitäten des 5'- und des 3'-Endes. **B.** IT-Stabilitätsprofile der synthetisierten siRNAs.

3.2.1.2 Synthese von siRNA si315 mittels *in vitro* T7-Transkription

Nach der Sequenzauswahl stellte sich die Frage nach der Synthese der siRNAs. Dabei sollte neben chemisch synthetisierten siRNAs auch eine *in vitro* transkribierte siRNA eingesetzt werden. Jedoch weist die Transkription mit T7-RNA-Polymerase einige Eigenschaften auf, die die Synthese einer siRNA mit deren definierten Struktur erschweren. So besteht der T7-Promotor

aus einer konservierten Sequenz, die über den Transkriptionsstartpunkt hinaus reicht und für eine effiziente Transkription essentiell ist. Folglich beginnt jedes T7-Transkript mit den 5 Nukleotiden GGGAG. Außerdem zeigen *in vitro* Transkripte oftmals ein bis mehrere zusätzliche, matrizen-unabhängige Nukleotide am 3'-Ende (115). Unter Berücksichtigung der definierten siRNA-Struktur mit einem doppelsträngigen Bereich von 21 bp und 2 nt langen, einzelsträngigen Überhängen am 3'-Ende, musste zunächst eine Strategie für die Synthese entwickelt werden. Diese ist in Abbildung 18 dargestellt und wird im Folgenden kurz erläutert:

Für die Transkription wurde eine DNA-Matrize verwendet, die neben dem T7-Promotor auch die *sense* und *antisense*-Sequenz der siRNA si315 codiert. Diese beiden Sequenzen werden durch den 8 nt langen *spacer* getrennt, der die unimolekulare Hybridisierung der siRNA-Sequenzen ermöglicht. Die Herstellung der siRNA-Matrize erfolgt mit zwei synthetischen DNA-Oligonukleotiden in einer PCR-Reaktion (Abbildung 18, Schritt 1). Dabei können beide DNA-Oligonukleotide miteinander hybridisieren, da sie an ihren 3'-Enden komplementäre Sequenzen der *spacer*-Region codieren. Abbildung 18B (Spur 1) zeigt die Analyse des PCR Produktes auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel, das mit 85 bp die erwartete Länge zeigt. Nach der Transkription der siRNA-Matrize und der Hybridisierung sollte die RNA eine haarnadelförmige Struktur aufweisen, bei der die Schleife die *spacer*-Sequenz enthält. Dieses Molekül wird im weiteren Verlauf als prä-siRNA bezeichnet (Abbildung 18A, Schritt 2) und zeigt auf dem denaturierenden Polyacrylamidgel die erwartete Größe von 65 nt (Abbildung 18B, Spur 2). Für die Prozessierung dieser prä-siRNA wurden G-Nukleotide an bestimmten Positionen eingefügt, damit dort die Phosphodiesterbindungen durch die einzelstrangspezifische RNaseT1 gespalten werden können. Abbildung 18B zeigt die Verkürzung der prä-siRNA nach ihrer Prozessierung, die anhand einer Akkumulierung des erwarteten 23 nt Fragments detektierbar ist (Spur 3). Die resultierende RNA sollte nach dieser RNaseT1-Prozessierung eine siRNA-Struktur aufweisen und an ihren 3'-Enden phosphoryliert sein (Abbildung 18, Schritt 3). Da terminale Phosphatgruppen in siRNAs jedoch am 5'-Ende und Hydroxylgruppen am 3'-Ende lokalisiert sind (19,38), wurde die RNA mit T4-Polynukleotidkinase in Anwesenheit von ATP inkubiert. Diese Kinase phosphoryliert RNA-Moleküle am 5'-Ende und besitzt zudem eine 3'-Phosphataseaktivität. Um unvollständig prozessierte Zwischen-

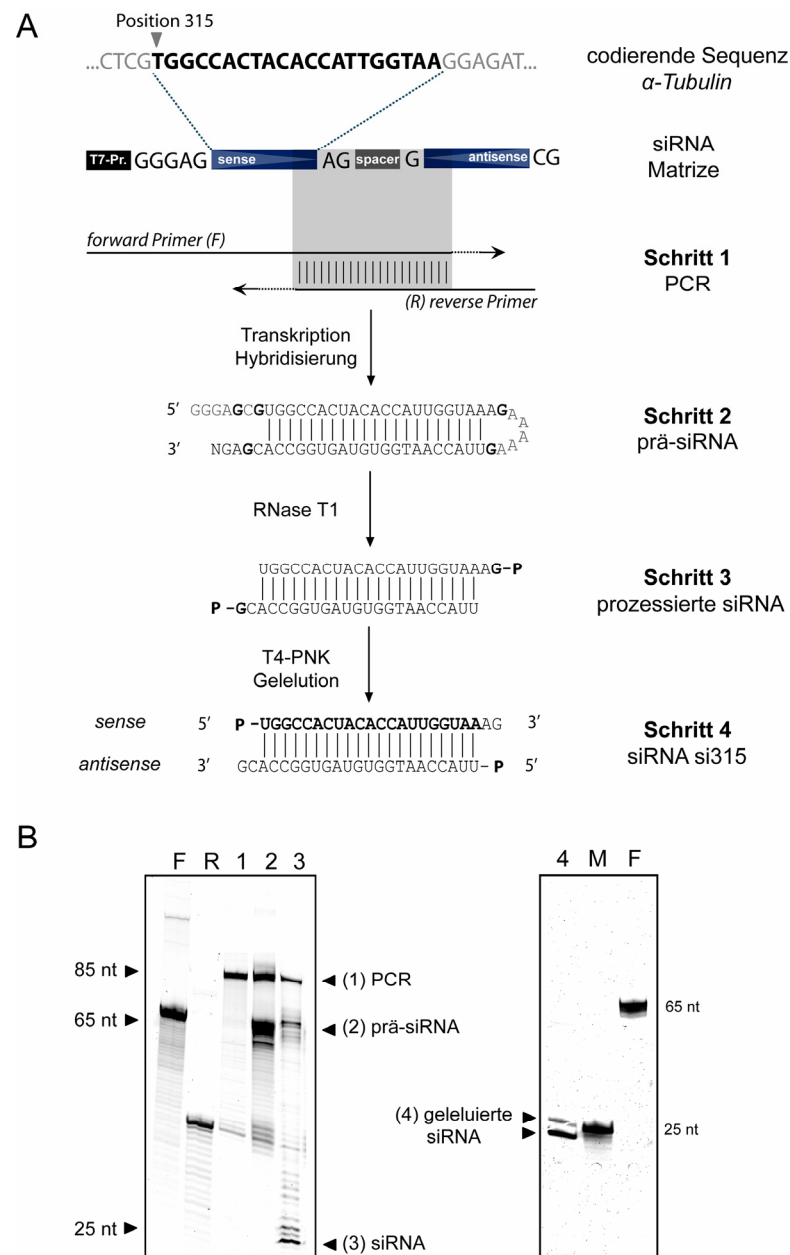


Abbildung 18. Herstellung einer *in vitro* transkribierten siRNA – A. Angewendete Strategie für die Herstellung der siRNA si315. Die Transkriptionsmatrize für die siRNA enthält den T7-Promotor (T7-Pr.), die *sense*- bzw. *antisense*-Sequenz der siRNA und eine *spacer*-Region, die die Schleife der prä-siRNA codiert. Die Sequenz GGGAG ist Bestandteil des T7-Promotors und die Transkription startet mit diesen 5 Nukleotiden. Der grau unterlegte Bereich markiert die komplementären Sequenzen des *forward* (F) und des *reverse* (R) *Primer*'s. Diese wurden für die Amplifikation der siRNA-Matrize mittels PCR (1) eingesetzt. Fett gedruckte Buchstaben in der prä-siRNA Sequenz (2) geben die potentiellen Schnittstellen der RNaseT1 an. P markiert die terminalen Phosphate in der prozessierten siRNA (3) und si315 (4). **B.** Zwischenprodukte und das Endprodukt der Synthese wurden auf denaturierende 12% (w/v) Polyacrylamidgelen aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit SYBR®Green II. Die Zahlen 1 bis 4 indizieren den jeweiligen Schritt des Herstellungsprozesses, wie er in A. angegeben ist. F (*forward Primer*, 65 nt), R (*reverse Primer*, 38 nt), M (25 nt RNA-Oligonukleotid), T4-PNK (T4-Polynukleotidkinase).

produkte abzutrennen, wurden die siRNAs abschließend unter nativen Bedingungen geleluert und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert. Dabei treten zwei RNA-Moleküle mit 23 nt und 25 nt auf (Abbildung 18B, Spur 4). Die 25 nt siRNAs kommen dadurch zustande, dass zwei zusätzliche Basenpaarungen am 5'-Ende des Transkriptes möglich sind und dadurch die Spaltung durch die RNaseT1 an einer abweichenden Position erfolgt. Für den weiteren Verlauf der Experimente war dies jedoch unerheblich, da abgesehen von einem um 2 bp verlängerten doppelsträngigen Bereichs die strukturellen Eigenschaften der siRNA unverändert bleiben. Insgesamt besteht die Präparation aus über 70% der 23 nt siRNA.

3.2.1.3 siRNA-vermitteltes *gene silencing* in Trypanosomen

Nach der Synthese wurden die siRNAs hinsichtlich ihrer *knock down* Effizienz untersucht. Dazu wurden prozyklische Trypanosomen der Zelllinie 29-13 *RNAi-Timer* mit den synthetischen siRNAs elektroporiert. Diese Zelllinie exprimiert das Reportergen *Timer* (siehe dazu auch Abschnitt 3.3.1), das ein fluoreszierendes Protein codiert. Dabei besitzt Timer die Eigenschaft, dass eine grüne Fluoreszenz ausschließlich bei Proteinmolekülen auftritt, deren Synthese nicht länger als etwa 20 Stunden zurückliegt. Daher kann man anhand dieser Fluoreszenz erkennen, ob die Transfektion der siRNAs zu einem unspezifischen *knock down* gegenüber anderen Genen führt. Ist dies der Fall, würde man neben dem Auftreten des FAT-Phänotyps auch eine Reduktion in der grünen Fluoreszenz erwarten. Darüber hinaus können bei der Quantifizierung des Phänotyps nur lebende Zellen berücksichtigt werden, die in den letzten 20 Stunden eine gleich bleibende Proteinbiosynthese durchgeführt haben.

Es wurden 50 µg der siRNAs si315, si329 und si956 sowie als Positivkontrolle α -Tubulin dsRNA und als Negativkontrolle Timer-dsRNA elektroporiert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion bezüglich ihrer Morphologie untersucht (Abbildung 19A). Dabei zeigt sich für die siRNAs si315 und si956 ein FAT-Phänotyp, der vergleichbar mit der Positivkontrolle ist (α -Tubulin dsRNA). Im Gegensatz dazu ist keine Veränderung der Zellmorphologie für die siRNA si329 und die unspezifische Timer-dsRNA detektierbar (Abbildung 19A und Daten nicht gezeigt). Für die Quantifizierung der FAT-Zellen wurden nur diejenigen Zellen berücksichtigt, die keine auffällige Änderung hinsichtlich ihrer grünen Fluoreszenz aufwiesen. Dabei zeigte sich nach der Auszählung von jeweils 400 Zellen, dass der Anteil der FAT-Zellen im Fall von α -Tubulin dsRNA und si315 mit 93% bzw. 85% am

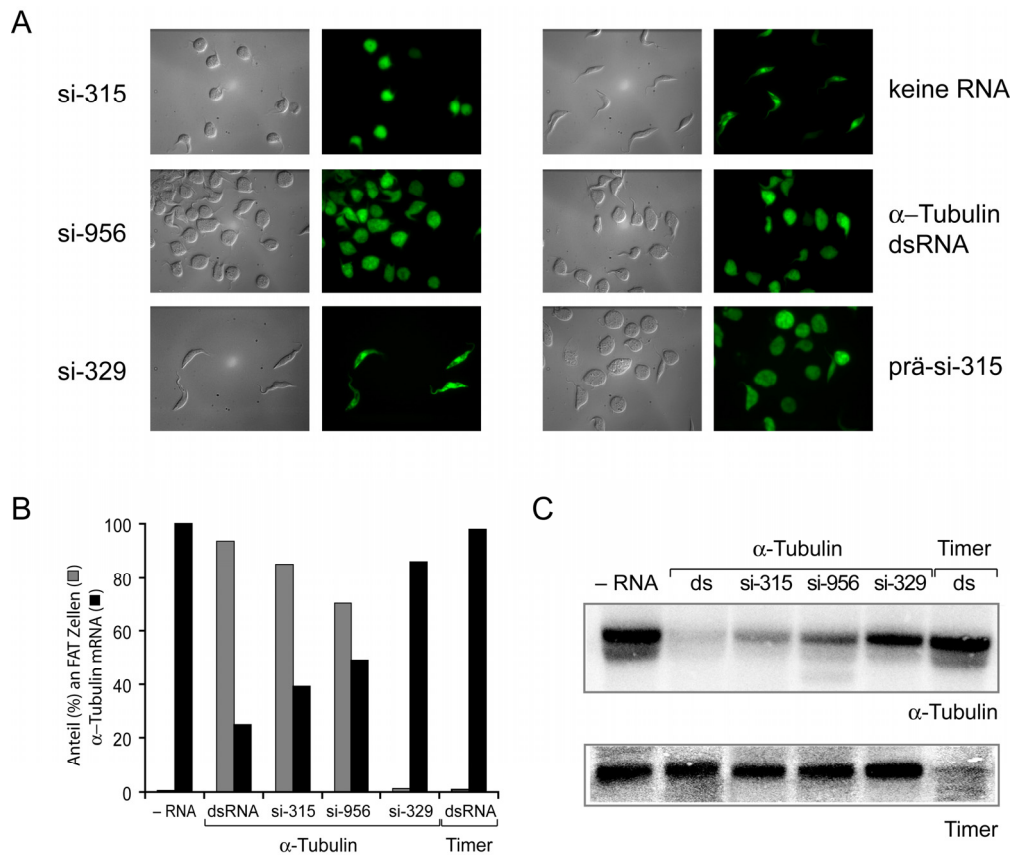


Abbildung 19. Elektroporation von *Trypanosoma brucei* mit siRNAs – A. DIC- und Fluoreszenzaufnahmen der Zelllinie *T. brucei* 29-13 RNAi-Timer 24 h nach der Elektroporation. **B.** Darstellung der relativen α -Tubulin mRNA Mengen (■) und der Anteile von FAT-Zellen (■). Für die Quantifizierung des FAT-Phänotypes wurden mindestens 400 Zellen berücksichtigt. **C.** Northern-Blot der Gesamt-RNA 18 h nach der Elektroporation. Die RNA wurde über ein denaturierendes 2,2% (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Als Sonden wurden radioaktiv markierte antisense-RNA der α -Tubulin bzw. der Timer codierenden Sequenz verwendet. –RNA (ohne RNA), ds (doppelsträngige RNA), prä-si315 (siehe Abbildung 18)

höchsten waren (Abbildung 19B). Ein niedrigerer Wert konnte nach der Transfektion von si956 mit 70% FAT-Zellen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu waren für die siRNA si329 und die Negativkontrollen (ohne RNA und Timer dsRNA) lediglich ein Anteil von unter 1% an FAT-Zellen detektierbar.

Im Fall eines RNAi-bedingten Effektes sollte eine spezifische Abnahme der α -Tubulin mRNA mit dem FAT-Phänotyp koinzidieren. Um Veränderungen der α -Tubulin mRNA zu analysieren, wurde Gesamt-RNA 18 Stunden nach der Elektroporation isoliert und ein Northern-Blot mit radioaktiven Sonden

gegen α -Tubulin- und Timer-mRNA als unspezifische Kontrolle durchgeführt (Abbildung 19C). Beim Vergleich der Timer-mRNA kann man nach der Elektroporation der siRNAs keine Unterschiede in den Signalintensitäten feststellen. Im Gegensatz dazu zeigt die α -Tubulin mRNA eine Reduktion im Fall der Positivkontrolle (α -Tubulin dsRNA) sowie der beiden siRNAs si315 und si956 (Abbildung 19C).

Die Quantifizierung der relativen Signalintensitäten für die α -Tubulin mRNA ist im Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 19B). Dabei wurde der Quotient aus den Signalintensitäten von α -Tubulin und Timer-mRNA berechnet. Insgesamt zeigt die Quantifizierung der α -Tubulin mRNA-Signale ein reziprokes Verhalten gegenüber dem Anteil an FAT-Zellen. Hohe Anteile des FAT-Phänotyps korrelieren dabei mit einem geringen α -Tubulin mRNA-Niveau, wie im Fall der α -Tubulin dsRNA (25% mRNA, 93% FAT) oder si315 (39% mRNA, 85% FAT). Im Gegensatz dazu ist für die Negativkontrolle (Timer-dsRNA) keine signifikante Reduktion im α -Tubulin mRNA-Niveau festzustellen. Dagegen kann nach der Elektroporation von si329 trotz abwesenden FAT-Phänotyps eine Reduktion um 14% nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Elektroporation synthetischer siRNAs zu einem spezifischen RNAi-Effekt in Trypanosomen führt. Die Effizienz des *knock down's* wird durch das IT-Stabilitätsprofil der eingesetzten siRNA determiniert.

3.2.2 Der RISC *in vitro* Assay (RIVA) – Rekapitulation des Effektorschrittes *in vitro*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass siRNA si315 eine effiziente und sequenzspezifische Degradation von α -Tubulin mRNAs *in vivo* mediiert, sollte diese Reaktion auch *in vitro* rekapituliert und charakterisiert werden. Dazu wurden 10 pM intern radioaktiv markierte α -Tubulin-mRNA (233 nt) und 10 nM siRNA si315 in zytoplasmatischem Lysat inkubiert. Nach der Aufarbeitung wurde die RNA auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert (Abbildung 20). Das Autoradiogramm in Abbildung 20 zeigt einen repräsentativen Zeitverlauf für den RISC *in vitro* Assay (RIVA). Dabei ist in Anwesenheit von si315 bereits nach 30 Minuten ein RNA-Fragment detektierbar, das im weiteren Zeitverlauf akkumuliert. Die Position dieses

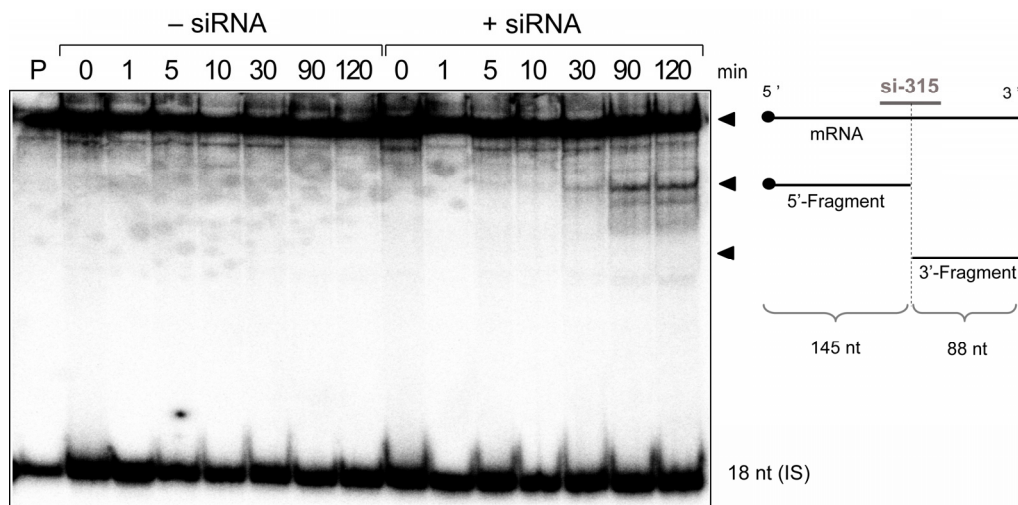


Abbildung 20. RISC *in vitro* Assay (RIVA) – Das Autoradiogramm zeigt die zeitabhängige *in vitro* Reaktion des RISCs in *Trypanosoma brucei*. Intern radioaktiv markierte α -Tubulin mRNA (233 nt) wurde in Abwesenheit (-siRNA) oder Anwesenheit (+siRNA) von si315 in zytoplasmatischem Lysat inkubiert. Im Anschluss wurden die Nukleinsäuren auf einem denaturierenden 10% (w/v) Polyacrylamidgel elektrophoretisch separiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm des RIVAs. Rechts daneben ist eine schematische Darstellung der mRNA und der erwarteten Fragmente nach der RISC-katalysierten Spaltung abgebildet. Der graue Balken markiert die homologe Region von si315 auf der mRNA. Die unterbrochene Linie indiziert das Zentrum der siRNA bzw. die erwartete Spaltposition auf der mRNA. IS (interner Standard, 18 nt RNA-Oligonukleotid), P (Kontrollreaktion in Reaktionspuffer).

Fragments entspricht der Länge des erwarteten 5'-Spaltproduktes der mRNA (145 nt). Dagegen kann kein Signal für das 3'-Fragment mit 88 nt detektiert werden. Um auszuschließen, dass das auftretende Fragment ein Produkt unspezifischer Nukleaseaktivität im zytoplasmatischen Lysat ist, wurde ein Kontrollansatz in Abwesenheit von siRNAs inkubiert (-siRNA). In diesem können jedoch keine RNA-Fragmente mit vergleichbarer Größe detektiert werden.

3.2.2.1 siRNAs determinieren die Spezifität der mRNA-Spaltung

Weiterführende Charakterisierungen adressierten die Frage, ob die siRNA die Spezifität der mRNA-Spaltung im RIVA determiniert. Dazu wurde zunächst der Einfluss steigender siRNA-Konzentrationen untersucht. In zytoplasmatischem Extrakt wurden 10 pM radioaktiv markierte α -Tubulin mRNA mit 10 bis 200 nM si315 inkubiert. Das Autoradiogramm und der Graph in Abbildung 21A zeigen, dass steigende siRNA-Konzentrationen zu einer Zunahme des 5'-mRNA Spaltproduktes führen. Daraus kann geschlossen werden, dass siRNA si315 einen positiven Einfluss auf die mRNA-Spaltung

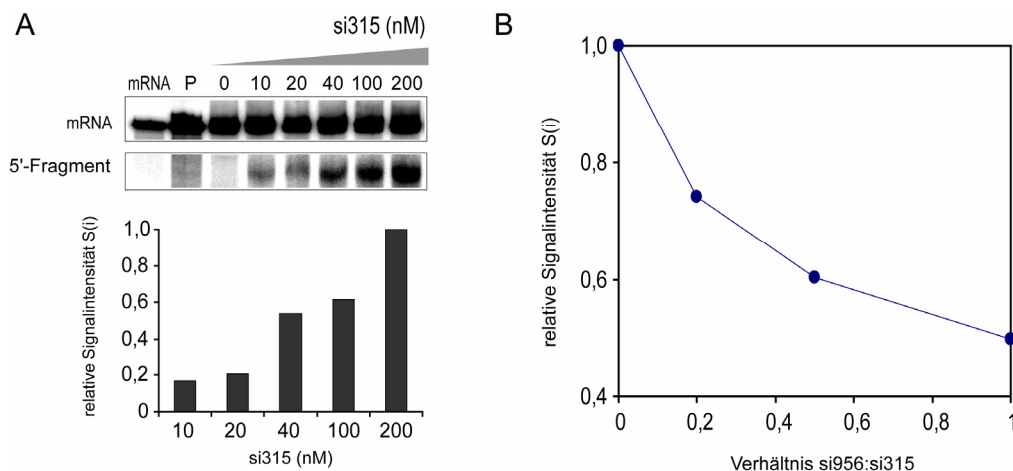


Abbildung 21. RIVA Titrations- und Konkurrenzexperimente - A. RIVA mit ansteigenden Konzentrationen an siRNA si315. Dabei sind nur die Ausschnitte des denaturierenden 10% (w/v) Polyacrylamidgels abgebildet, die die mRNA und das 5'-Fragment zeigen. Darunter ist die Quantifizierung der relativen Signalintensitäten $S(i)$ dargestellt. Dabei wurden alle Werte auf die Signalintensität des Ansatzes mit 200 nM si315 normiert. P (Kontrollreaktion in Reaktionspuffer mit 200 nM si315). **B.** Konkurrenzassay mit ansteigenden Konzentrationen an si956 (Kompetitor) in Anwesenheit von 200 nM si315. Im Graph wurden die relativen Signalintensitäten $S(i)$ gegen das Verhältnis von unspezifischer si956 zu si315 aufgetragen. Normiert wurden die Werte wie in A.

im RIVA besitzt. Das nächste Experiment sollte nachweisen, ob dieser Einfluss sequenzspezifisch ist. In diesem Fall sollte die Hydrolyse der mRNA durch steigende Konzentrationen an unspezifischer siRNA kompetierbar sein. Als Kompetitor für si315 wurde siRNA si956 ausgewählt, da diese einen vergleichbaren RNAi-Effekt *in vivo* auslöst (vgl. Abbildung 19). Darüber hinaus besitzt si956 keine homologe Zielsequenz auf der im Assay verwendeten α -Tubulin mRNA. In einem RIVA-Kontrollexperiment mit si956 und α -Tubulin mRNA wurde folglich auch keine Spaltung detektiert (Daten nicht gezeigt). Für das Konkurrenzexperiment wurden neben radioaktiver α -Tubulin mRNA (10 pM) und si315 (200 nM) steigende Konzentration von siRNA si956 zugegeben (bis 200 nM). Der Graph in Abbildung 21B zeigt die Quantifizierung der relativen Signalintensitäten des auftretenden 5'-Fragments. Dabei ist eine Abnahme des Spaltproduktes bei zunehmenden Konzentrationen an si956 zu beobachten. Diese reziproke Korrelation zeigt die Spezifität der mRNA Spaltung im RIVA, die durch die homologe Sequenz der siRNA si315 determiniert wird.

3.2.2.2 Funktionelle siRNAs medieren die präferentielle Spaltung der *sense*-mRNA

Da siRNAs symmetrische Moleküle sind, würde man neben der Spaltung der mRNA auch die spezifische Degradation der entsprechenden komplementären *antisense*-RNA erwarten. Jedoch konnte in Studien mit *Drosophila* Zellextrakten gezeigt werden, dass die Stabilität der terminalen Sequenzabschnitte der siRNA entscheidet (siehe Abschnitt 1.3.2), ob *sense*- oder *antisense*-mRNA erkannt und gespalten wird (75). Folglich sollte untersucht werden, ob im RIVA ebenfalls eine präferentielle Spaltung von *sense*- oder *antisense*-mRNA durch si315 mediert wird. Dazu wurde siRNA si315 mit jeweils intern radioaktiv markierter *sense*- oder *antisense*-mRNA

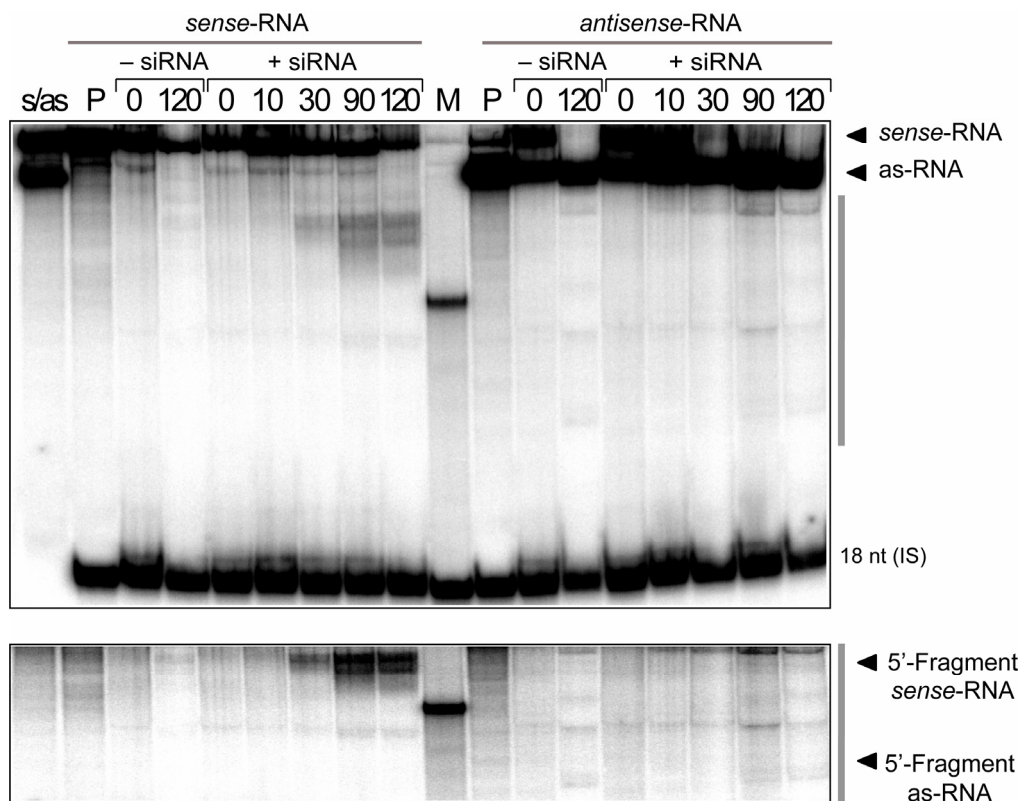


Abbildung 22. RISC *in vitro* Assay mit *sense* und *antisense* RNA – Intern radioaktiv markierte *sense* (s) oder *antisense* (as) mRNA wurden in Anwesenheit (+siRNA) oder Abwesenheit (-siRNA) von si315 inkubiert. Im oberen Bild ist das Autoradiogramm des denaturierenden 10% (w/v) Polyacrylamidgels dargestellt. Die Angaben am oberen Rand indizieren die Inkubationszeit in Minuten. Der graue Balken markiert den Ausschnitt des Autoradiogramms, der im unteren Abschnitt mit angepasstem Kontrast dargestellt ist. Die schwarzen Pfeile am Rand des unteren Gelabschnittes indizieren die Positionen für die erwarteten 5'-Fragmente nach der Hydrolyse der *sense*- bzw. der *antisense*-mRNA. IS (interner Standard, 18 nt RNA-Oligonukleotid), s/as (*sense*- bzw. *antisense* mRNA), P (Kontrollreaktion in Reaktionspuffer), M (RNA-Oligonukleotide, 85 nt).

in zytoplasmatischem Lysat inkubiert. Das Autoradiogramm in Abbildung 22 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Dabei kann die Akkumulation des erwarteten 5'-Spaltproduktes lediglich für die *sense*-mRNA, jedoch nicht für die *antisense*-mRNA detektiert werden. In Analogie zu *in vitro* Assays aus *Drosophila* zeigt die RIVA-Aktivität ebenfalls eine präferentielle Spaltung einer der beiden potentiellen Ziel-RNAs.

3.3 Nachweis von RNAi-Komponenten: Das RNAi *in vivo* System

Bisher wurde eine Reihe von RNAi-Komponenten in anderen Organismen identifiziert (25,51,57,61,77,86) und auch in *T. brucei* weisen Datenbankvergleiche auf homologe Proteine hin (87,109,110). Es stellt sich die Frage, wie eine Beteiligung dieser putativen Komponenten im RNAi-Mechanismus nachgewiesen werden kann. In dem folgenden Abschnitt wird daher ein Assay vorgestellt, mit dessen Hilfe RNAi-Komponenten *in vivo* identifiziert werden können.

3.3.1 Konzept des RNAi *in vivo* Systems

Die Idee des RNAi *in vivo* Systems basiert darauf, dass anhand des Expressionsniveaus eines Fluoreszenzgens die Entscheidung getroffen werden kann, ob es sich bei einem gegebenen Protein um eine RNAi-Komponente handelt (Abbildung 23). Dabei deuten fluoreszierende Zellen auf eine essentielle RNAi Komponente hin. Dieses *in vivo* System wurde in der transgenen Trypanosomen-Zelllinie 29-13 etabliert, die den Tetrazyklin (Tet) Repressor und die T7-RNA-Polymerase konstitutiv exprimiert (116). Im Wesentlichen besteht das *in vivo* System aus drei Komponenten, die in Abbildung 23 dargestellt sind und die im Folgenden genauer erläutert werden:

- 1) **Die konstitutive Expressionskassette** besteht aus einem T7-Promotor und einem Reportergen, das ein fluoreszierendes Protein codiert. Die konstitutive Expression des Reportergens führt zu einer Fluoreszenz in den Trypanosomenzellen.
- 2) **Die konstitutive RNAi-Kassette** bewirkt die Expression einer haarnadelförmigen dsRNA, deren doppelsträngiger Bereich homolog zu der Sequenz des Reportergens ist. In Trypanosomenzellen mit funktionellem RNAi führt dieses zu einem *knock down* des Reportergens und damit zu einer verminderten Fluoreszenz.
- 3) **Die induzierbare RNAi-Kassette** wird von zwei T7-Promotoren flankiert, die die Expression einer dsRNA von jedem beliebigen DNA-Abschnitt ermöglicht. Dabei steht die Expression unter der Kontrolle des Tetrazyklin-Operators, so dass die Transkription der dsRNA nur in Anwesenheit von Tetrazyklin erfolgt.

Um ein Protein auf seine Beteiligung im RNAi-Mechanismus zu testen, wird die codierende DNA-Sequenz zwischen die beiden T7-Promotoren der induzierbaren RNAi-Kassette inseriert. Dabei müssen zwei Fälle unterschieden werden:

- a) Die inserierte Sequenz ist **keine RNAi-Komponente**. Nach der Induktion mit Tetrazyklin sollte der RNAi-Mechanismus in den Zellen unbeeinflusst bleiben und dadurch der konstitutive *knock down* des Reportergens bestehen bleiben. Daher sollte keine Fluoreszenz detektierbar sein (Abbildung 23).

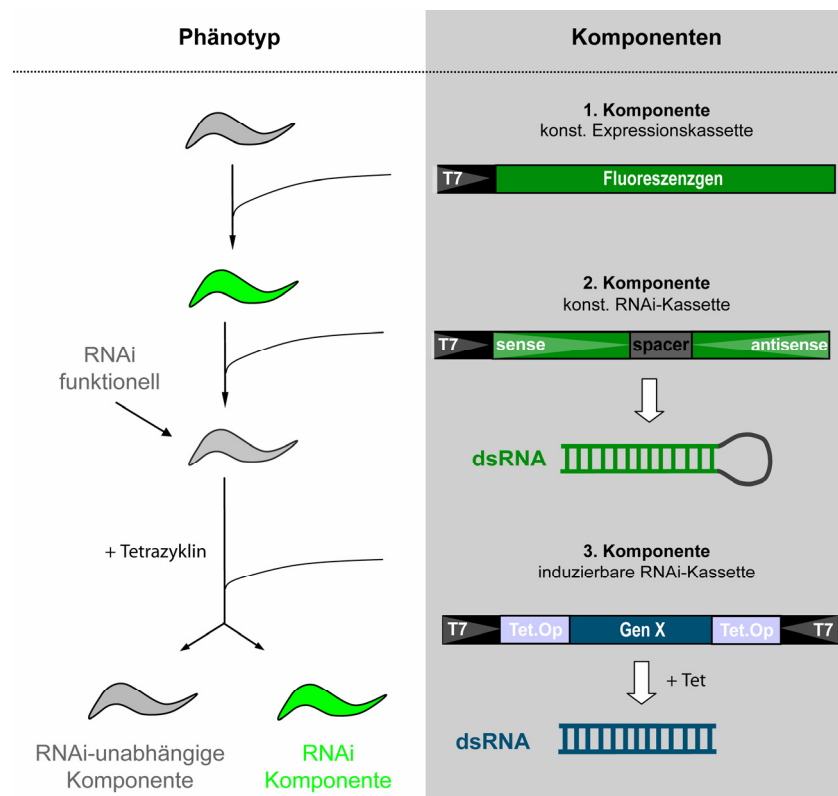


Abbildung 23. Konzept des RNAi *in vivo* Systems – In diesem Schaubild werden die drei Komponenten des RNAi *in vivo* Systems vorgestellt (rechts) und deren erwartete, additive Effekte auf den Phänotyp von *T. brucei* 29-13 gezeigt (links). Diese Komponenten sind Bestandteile eines Plasmids, das stabil in das Genom von *T. brucei* 29-13 integriert wird. Anhand der Fluoreszenz der Zellen kann entschieden werden, ob es sich beim Gen X in der induzierbaren RNAi-Kassette um eine essentielle RNAi-Komponente handelt. Nur im Fall einer essentiellen Komponente werden nach der Tetrazyklin-Induktion fluoreszierende Trypanosomen erwartet. Handelt es sich dagegen um keine essentielle Komponente, so sollte die Fluoreszenz der Zellen reduziert bleiben. T7 (Promotor für die T7-RNA-Polymerase), Tet.-Op (Tetrazyklin Operator).

- b) Bei der inserierten DNA-Sequenz handelt es sich um **eine essentielle RNAi-Komponente**. Die Induktion mit Tetrazyklin sollte den *knock down* der RNAi-Komponente auslösen. Die Folge wäre eine eingeschränkte RNAi-Reaktion, so dass der konstitutive *knock down* des Reportergens abgeschwächt wird. Folglich sollte eine Fluoreszenz detektierbar sein (Abbildung 23).

Bei der Etablierung dieses *in vivo* Systems wurde als Reporter das Protein Fluorescent Timer ausgewählt (117). Dieses besitzt zwei unterschiedliche Absorptions- und Emissionsmaxima, die in Abhängigkeit der Zeit auftreten (Abbildung 24E). Kurz nach der Synthese zeigt das Protein eine grüne Fluoreszenz. Jedoch verschiebt sich das Emissionsmaximum nach wenigen Stunden in Richtung des langwelligen Bereichs. So zeigen Proteine, deren Synthese länger als etwa 20 Stunden zurückliegt eine rote Fluoreszenz. Der Vorteil dieses Reporters liegt darin, dass eine hohe Stabilität des Proteins keinen Einfluss auf die Detektion der grünen Fluoreszenz hat, da diese nur in einem Zeitfenster von 20 Stunden nach der Synthese detektierbar ist. Folglich sollte die Intensität der grünen Fluoreszenz als Nachweis für das RNAi *in vivo* System verwendet werden.

3.3.2 Test des RNAi-Phänotyps von Fluorescent Timer

Für die Anwendung von *Fluorescent Timer* (Timer) als Reporter gen musste zunächst untersucht werden, ob dessen RNAi-Phänotyp überhaupt für das *in vivo* System geeignet ist. Dazu wurde das Plasmid pRNAi-Timer stabil in den transkriptionell stillen rDNA-*spacer* des Genoms der Trypanosomen-Zelllinie 29-13 integriert. Das Plasmid besteht aus einer konstitutiven Expressionskassette und einer Tetrazyklin-induzierbaren RNAi-Kassette für Timer (Abbildung 24A). Nach der Transfektion zeigten die Zellen wie erwartet eine grüne und rote Fluoreszenz, die aus der konstitutiven Expression von Timer resultiert. Für die Analyse des RNAi-Phänotyps wurde die Expression der Timer-dsRNA durch die Zugabe von Tetrazyklin induziert. Dabei wurde der Phänotyp durch Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert (Abbildung 24B) und die Fluoreszenz innerhalb von 72 Stunden nach der Induktion quantifiziert (Abbildung 26A). In diesem Zeitverlauf reduziert sich die grüne Fluoreszenz nach 24 Stunden auf 70% und nach 72 Stunden auf einen Wert von 10% der ursprünglichen Intensität. Im Gegensatz dazu ist für die rote Fluoreszenz eine verzögerte Reduktion der Intensität erkennbar, die nach 72 Stunden auf einen

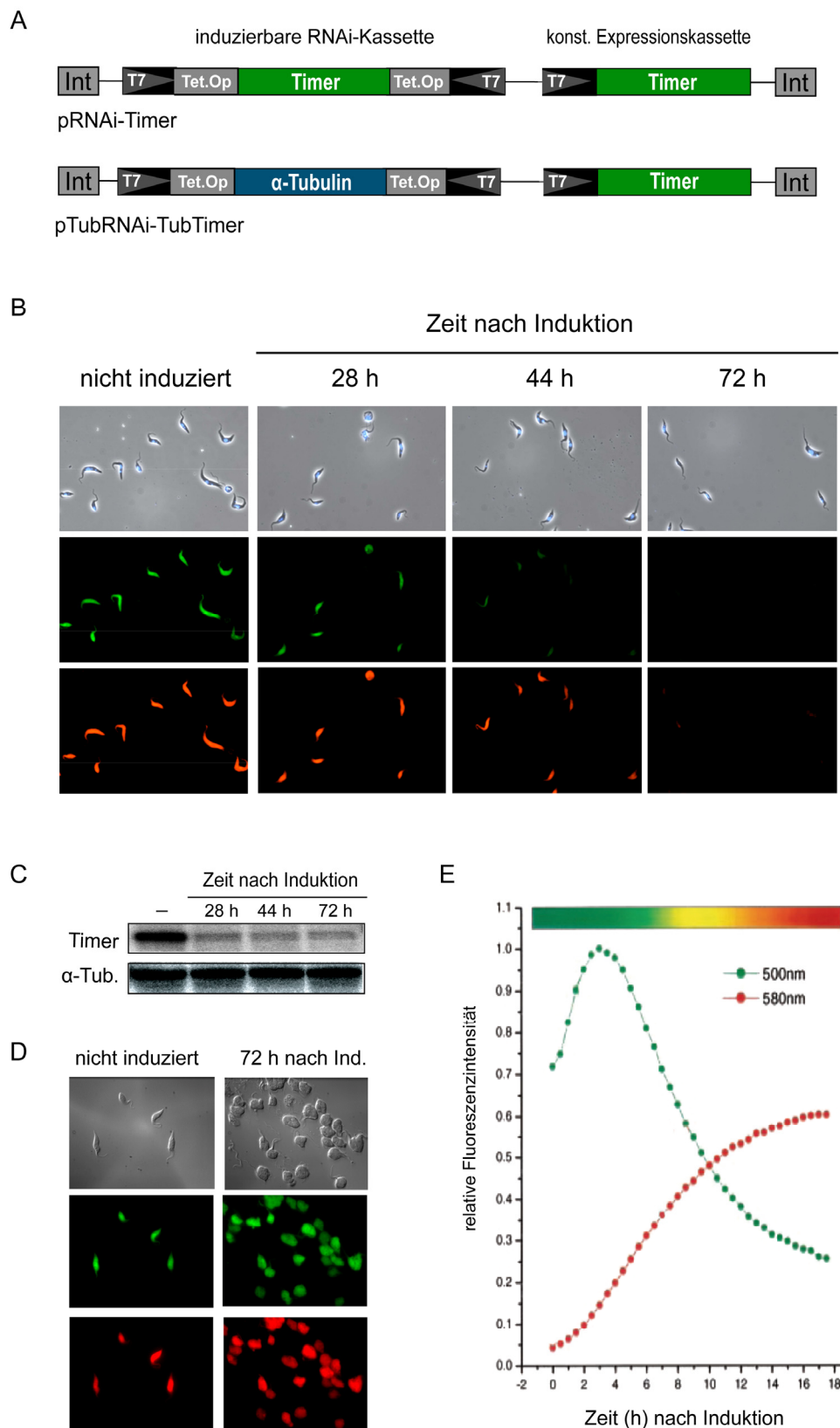


Abbildung 24. Timer und sein RNAi-Phänotyp in *Trypanosoma brucei* 29-13 - **A.** Die Abbildung zeigt die DNA-Konstrukte pRNAi-Timer und pTubRNAi-TubTimer, die in den transkriptionell stillen rDNA-*spacer* (Int) des *T. brucei* Genoms integriert werden können. Beide Konstrukte besitzen eine konstitutive Expressionskassette für das Fluoreszenzgen *Timer*. Darüber hinaus ist eine induzierbare RNAi-Kassette integriert, die von zwei gegensätzlich orientierten T7-Promotoren (T7) die Transkription von dsRNA ermöglicht. Dabei wird die Transkription durch jeweils zwei Tetrazyklin-Operatoren (Tet.-Op) gesteuert. Beide Konstrukte unterscheiden sich in der Sequenz, die in die induzierbare RNAi-Kassette integriert wurde. **B.** DIC- (obere Reihe) und Fluoreszenzaufnahmen (unteren beiden Reihen) der pRNAi-Timer Zelllinie vor bzw. nach Tetrazyklin-Induktion (Zeiten nach Induktion angegeben). Die Anregungswellenlänge für die grüne Fluoreszenz ist 470 nm und für die rote Fluoreszenz 546 nm. **C.** *Northern-Blot* mit Gesamt-RNA aus der Zelllinie pRNAi-Timer vor und nach der Induktion mit Tetrazyklin. Dabei wurden radioaktiv markiert Sonden gegen Timer und α -Tubulin mRNA verwendet. **D.** Dokumentation der Zelllinie pTubRNAi-TubTimer vor und nach der Induktion mit Tetrazyklin. **E.** Abbildung übernommen von Tersikh *et al.*, 2001 (117). Dabei wurde die Emissionen von *in vitro* synthetisiertem Timer-Protein bei einer Wellenlänge von 500 nm (grün) und 580 nm (rot) in einem Zeitverlauf bestimmt. Der Farbverlauf (oben) zeigt die Überlagerung der beiden Fluoreszenzfarben.

Wert von etwa 40% fällt. Dieser Phänotyp entspricht der Erwartung, da nach der Induktion von RNAi die *de novo* Synthese von Timer weitgehend inhibiert wird. In den ersten 20 Stunden nach der Tetrazyklin-Induktion verändern daher die vorhandenen, grün-fluoreszierenden Proteinmoleküle ihr Emissionsmaximum, so dass die grüne Fluoreszenz in ihrer Intensität reduziert wird. Da Proteinmoleküle mit einer roten Fluoreszenz erst zeitverzögert auftreten, ist dort eine Abnahme auch erst später detektierbar.

Neben der Fluoreszenzanalyse wurde der RNAi-Effekt auch auf molekularer Ebene untersucht. Im Fall eines RNAi-abhängigen *knock down's* sollte eine spezifische Degradation der Timer-mRNA zu detektieren sein. *Northern-Blots* mit radioaktiv markierten Sonden gegen Timer und α -Tubulin zeigen, dass der oben beschriebene Phänotyp mit einer spezifischen Reduktion der Timer-mRNA koinzidiert (Abbildung 24C). Um auszuschließen, dass dieser Phänotyp unspezifisch durch die Expression von dsRNA ausgelöst wird, wurde ein weiteres DNA-Konstrukt stabil in die Trypanosomenzelllinie 29-13 transfiziert. Dieses wird als pTubRNAi-TubTimer bezeichnet und dessen Aufbau ist in Abbildung 24A dargestellt. pTubRNAi-TubTimer unterscheidet sich von pRNAi-Timer lediglich durch die inserierte Sequenz in der induzierbaren RNAi-Kassette. Dabei wurde die Timer-Sequenz durch ein etwa gleich langes DNA-Fragment (650 bp) aus dem α -Tubulin Gen substituiert. Folglich sollte die Zugabe von Tetrazyklin zum *knock down* von α -Tubulin führen. Abbildung 24D zeigt die Zellen vor und 72 Stunden nach der Induktion. Wie erwartet ist für beide Zeitpunkte eine grüne und eine rote Fluoreszenz zu detektieren. Im Gegensatz zu pRNAi-Timer zeigt diese Zelllinie jedoch einen ausgeprägten FAT-Phänotyp nach 72-stündiger

Induktion. *Northern-Blots* mit der Gesamt-RNA dieser Zellen weisen ebenfalls auf eine spezifische Degradation der α -Tubulin mRNA hin (Abbildung 26C).

Zusammenfassend zeigt die Zelllinie pRNAi-Timer einen spezifischen RNAi-Effekt gegen Timer. Dieser kann sowohl auf phänotypischer als auch auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Daher ist Timer als Reporter für das RNAi *in vivo* System geeignet.

3.3.3 Nachweis von TbAgo1 als essentielle RNAi-Komponente

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass Timer einen gut detektierbaren RNAi-Phänotyp aufweist, sollte das *in vivo* System mit einer geeigneten Positiv- und Negativkontrolle getestet werden. Dazu wurden zwei DNA-Konstrukte hergestellt, die alle drei Komponenten des RNAi *in vivo* Systems mit Timer als Reportergen enthalten (vgl. Abbildung 23 und Abbildung 25A). Der Unterschied der beiden Konstrukte besteht lediglich in der Sequenz, die zwischen die T7-Promotoren der induzierbaren RNAi-Kassette inseriert wurde. Dabei wurde für die Positivkontrolle (pAgo1RNAi-TocRL) ein Teil des Ago1-Gens als essentielle RNAi-Komponente und für die Negativkontrolle (pTubRNAi-TocRL) ein etwa gleichgroßes Fragment des α -Tubulin Gens inseriert. Der Vorteil von α -Tubulin als RNAi-unspezifische Kontrolle ist der definierte FAT-Phänotyp, der nach dem *knock down* auftreten sollte (12).

Nach der Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden die Phänotypen im induzierten und nicht-induzierten Zustand untersucht. Abbildung 25B zeigt eine Gegenüberstellung der erwarteten und der beobachteten Phänotypen vor und nach der Induktion mit Tetrazyklin. Im Fall der Negativkontrolle stimmen die erwarteten mit dem tatsächlich beobachteten Phänotypen überein. Abweichungen gibt es jedoch für die Zellen der Positivkontrolle, bei denen bereits vor der Induktion eine Fluoreszenz detektierbar ist. Die Quantifizierung der Fluoreszenz in Abbildung 26A zeigt dabei einen 10-fach höheren Wert als bei den nicht-induzierten Zellen der Negativkontrolle. Diese Fluoreszenzintensität erfährt auch 144 Stunden nach der Induktion mit Tetrazyklin keine signifikante Änderung.

Neben dem abweichenden Phänotyp für die nicht-induzierten Zellen der Positivkontrolle zeigten sich auch Veränderungen für die Zellen der

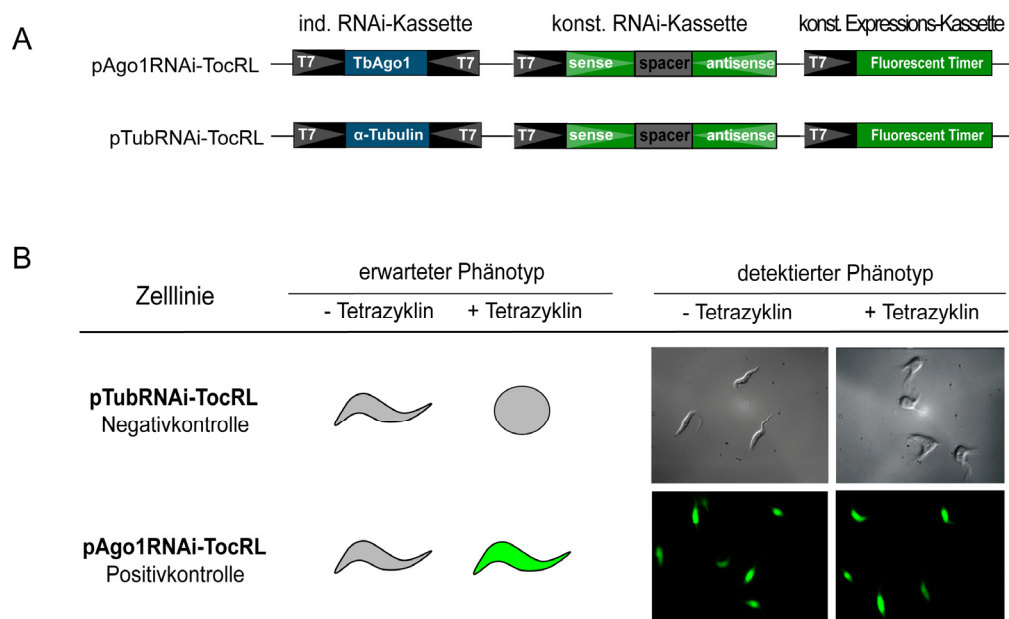


Abbildung 25. Test des RNAi *in vivo* Systems – A. Die DNA-Konstrukte der Positivkontrolle pAgo1RNAi-TocRL und der Negativkontrolle pTubRNAi-TocRL sind schematisch dargestellt. Die Tetrazyklin-Operatoren wurden für die induzierbaren RNAi-Kassetten der Übersicht wegen weggelassen. ind. (induzierbare); konst. (konstitutive); T7 (T7-Promotor). **B.** Darstellung der erwarteten und detektierten Phänotypen vor und nach 72 h nach Induktion mit Tetrazyklin. Die Induktion wurde 4 Wochen nach der stabilen Transfektion des jeweiligen DNA-Konstruktes durchgeführt. Die Bilder zeigen DIC- und Fluoreszenzaufnahmen (Exzitation: 470 nm).

Negativkontrolle (pTubRNAi-TocRL), nachdem diese über mehr als 3 Monate in Zellkultur passagiert wurden. Dabei fiel auf, dass fast alle Zellen keinen FAT-Phänotyp mehr nach der Induktion mit Tetrazyklin aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte in einem *Northern-Blot* nachgewiesen werden, dass das Niveau der α -Tubulin mRNA vor und nach der Induktion nahezu unverändert bleibt (Abbildung 26C). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die Zelllinie pTubRNAi-TubTimer (Abbildung 24A, D) gemacht, bei der wie für pTubRNAi-TocRL eine induzierbare RNAi-Kassette für α -Tubulin stabil in das Genom von *T. brucei* 29-13 integriert wurde (Daten nicht gezeigt). Eine erneute stabile Transfektion der Konstrukte für die Positivkontrolle und die Negativkontrolle führte wiederum zu den in Abbildung 25 dargestellten Phänotypen (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für die Abweichungen liegt in der unvollständigen Repression der dsRNA-Synthese, wie sie bereits für die hier angewendete induzierbare RNAi-Kassette publiziert wurde. So wurde eine Hintergrundexpression von

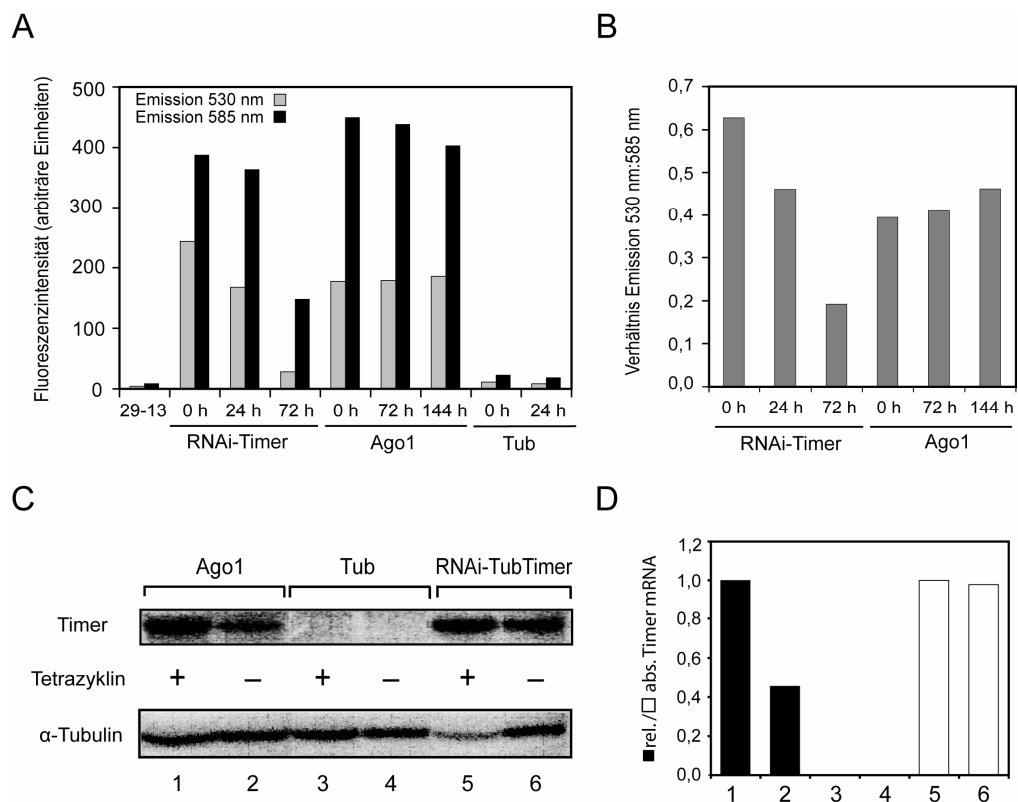


Abbildung 26. Quantifizierung der Fluoreszenz und der mRNA – Die Abbildungen zeigen die Quantifizierung der Fluoreszenz und der mRNA für die Zelllinien Ago1RNAi-TocRL (Positivkontrolle) und TubRNAi-TocRL (Negativkontrolle). **A.** Quantifizierung der Fluoreszenz von mehr als 10^5 Zellen mit einer Emission von 530 nm (grün) bzw. 585 nm (rot). Es werden die durchschnittlichen, arbiträren Fluoreszenzeinheiten in dem Graph dargestellt. **B.** Darstellung der Verhältniswerte der in A. gemessenen Emissionen bei einer Wellenlänge von 530 nm und 585 nm. **C.** Northern-Blot mit je 20 µg Gesamt-RNA, elektrophoretisch aufgetrennt in einem denaturierenden 1,5% (w/v) Agarosegel. Für die Detektion wurden intern radioaktiv markierte Sonden gegen α -Tubulin und Timer mRNA verwendet. Gesamt RNA wurde von den Zellen vor (-) und 90 Stunden nach der Induktion mit Tetrazyklin (+) präpariert. Tub induziert die Zellen der Negativkontrollen und Ago1 die Zellen der Positivkontrolle 16 Wochen nach der stabilen Transfektion. Die RNA der Zelllinie RNAi-TubTimer wurden 5 Wochen nach der stabilen Transfektion präpariert. Die Zahlen unterhalb der Autoradiogramme korrespondieren mit der Quantifizierung in **D.** Dabei werden die in C. erhaltenen relativen (■) bzw. absoluten Signalintensitäten (□) der Timer-mRNA dargestellt. Die relativen Signalintensitäten berechnen sich aus dem Verhältnis von Timer- und α -Tubulin mRNA. Dabei wurden die relativen bzw. absoluten Signalintensitäten gegen die Werte von Spur 1 bzw. Spur 5 normiert. Die Zeitangaben geben die Zeit nach Induktion mit Tetrazyklin an. Ago1 (Zelllinie pAgo1RNAi-TocRL); Tub (Zelllinie pTubRNAi-TocRL); 29-13 (Zelllinie *T. brucei* 29-13); RNAi-Timer (Zelllinie pRNAi-Timer); RNAi-TubTimer (Zelllinie pRNAi-TubTimer)

dsRNA auch in Abwesenheit von Tetrazyklin für die entsprechenden Zelllinien nachgewiesen (118). Übertragen auf die Zellen der Positivkontrolle würde das bedeuten, dass wie beobachtet eine Fluoreszenz bereits im nicht-induzierten Zustand detektierbar wäre. Darüber hinaus würde man nach der Induktion mit

Tetrazyklin eine Zunahme der Timer-mRNA und daraus resultierend eine Zunahme der Fluoreszenzintensität erwarten.

Um das Niveau der Timer-mRNA für die Positivkontrolle vor und nach der Induktion mit Tetrazyklin zu quantifizieren, wurde ein *Northern-Blot* mit radioaktiv markierten Sonden gegen Timer und α -Tubulin durchgeführt. Abbildung 26D zeigt die Quantifizierung der Timer-mRNA. Dabei kann ein Anstieg der Timer-mRNA um den Faktor 2,2 festgestellt werden (Abbildung 26D, Spur 1 und 2). Im Gegensatz dazu ist auf der phänotypischen Ebene selbst 144 Stunden nach Tetrazyklin-Induktion keine signifikante Zunahme der grünen Fluoreszenz zu beobachten (Abbildung 26A). Lediglich bei der Berechnung der Verhältnisswerte von grüner und roter Fluoreszenz kann eine Steigerung von 16% nach 144 Stunden Induktion detektiert werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Timer als Reporter für das *in vivo* System geeignet ist. Beim Test des Systems konnte für die Negativkontrolle (pTubRNAi-TocRL) sowohl im induzierten als auch im nicht induzierten Zustand der erwartete Phänotyp detektiert werden. Dagegen zeigt sich bei der Positivkontrolle (pAgo1RNAi-TocRL) sowohl im induzierten als auch im nicht-induzierten Zustand eine unveränderte Fluoreszenz. Die absoluten Werte für die grüne Fluoreszenz liegen um Faktor 10 höher als bei der Negativkontrolle.

4. Diskussion

RNA *interference* (RNAi) ist ein posttranskriptioneller *gene silencing* Mechanismus, der vermutlich einen frühen evolutiven Ursprung aufweist (54). So wurde RNAi bereits in Protozoen, Pilzen, Pflanzen und Tieren nachgewiesen (8-14). Der Auslöser für den zugrunde liegenden Mechanismus ist doppelsträngige RNA, die im Zytoplasma zum Abbau homologer mRNA führt und dadurch das *silencing* des entsprechenden Gens verursacht (14,20). Im Initiationsschritt des RNAi-Mechanismus' wird zunächst das dsRNA-Substrat durch die Ribonuklease Dicer in ca. 25 nt RNAs prozessiert (8,25,41). Diese Intermediate werden als siRNAs (*short interfering RNAs*) bezeichnet und besitzen eine weitgehend doppelsträngige Struktur (19,38). Der nachfolgende Effektorschritt beschreibt die sequenzspezifische Degradation der mRNA, die durch den Nukleasekomplex RISC (*RNA induced silencing complex*) und die siRNA katalysiert wird (26,41,68). Die siRNA ist dabei Bestandteil des RISCs und mediert die Erkennung des mRNA-Substrates über die Ausbildung komplementärer Basenpaarungen in einem siRNA:mRNA Hybrid (9,26,41,68,74). Die anschließende Degradation der mRNA wird durch deren endonukleolytische Spaltung eingeleitet (81,82). Diese erfolgt im zentralen Bereich des siRNA:mRNAs Hybrids und wird durch die RISC-Komponente *Slicer* katalysiert (1,73). Während das hier beschriebene Modell für *Drosophila* und den Menschen zutrifft, wurden divergente Eigenschaften für den Effektorschritt in ursprünglicheren Eukaryoten wie Pilzen und *C. elegans* festgestellt (58,69,91,95,96).

Trypanosoma brucei stellt phylogenetisch betrachtet den ursprünglichsten Vertreter dar, für den RNAi bisher nachgewiesen werden konnte (87). Jedoch ist bisher wenig über den Mechanismus bekannt (119). Daher war das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, den RNAi-Mechanismus in *T. brucei* auf seine konservierten Eigenschaften zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zwei *in vitro* Assays etabliert, die den Initiator- und Effektorschritt rekapitulieren. In einer biochemischen Charakterisierung des Initiationsschrittes konnte gezeigt werden, dass dieser bezüglich seiner Aktivität und seiner Produkte konserviert ist. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass prototypische siRNAs Produkte des Initiationsschrittes und Intermediate des RNAi-Mechanismus' sind. Diese sind im Effektorschritt an der mRNA-Spaltung beteiligt, die vergleichbare Eigenschaften mit der RISC-katalysierten Reaktion in *Drosophila* und dem Menschen aufweist.

Neben den *in vitro* Assays wurde auch ein *in vivo* Assay etabliert, mit dessen Hilfe putative RNAi-Komponenten auf ihre Funktion im RNAi-Mechanismus getestet werden können. Darüber hinaus bietet dieser Assay die Grundlage, neue RNAi-Komponenten mit Hilfe einer RNAi-*library* zu identifizieren.

4.1 Der Initiationsschritt zeigt konservierte Eigenschaften

Dicer-Orthologe wurden bisher in verschiedenen Spezies identifiziert und die Proteinsequenzen weisen eine konservierte Domänenstruktur auf (33,54). Es können in der Regel 4 unterschiedliche Domänen nachgewiesen werden: ATPase/Helikase-Domäne, dsRNA bindende Domäne (dsRBD), duale RNaseIII Domänen und eine PAZ-Domäne (25,44,57). Im Gegensatz dazu wurde kein *Dicer*-Ortholog in *T. brucei* identifiziert. Aufgrund einer fast vollständigen Genomdatenbank wird derzeit die Existenz eines divergenten *Dicers* in Erwägung gezogen (87). Neben *Dicer* ist auch wenig über siRNAs als Reaktionsprodukte des Initiationsschrittes bekannt. So ist derzeit unklar, ob siRNAs mit konservierter Struktur Intermediate des RNAi-Mechanismus' sind.

4.1.1 Untersuchung der Aktivität des Initiationsschrittes

4.1.1.1 RNaseIII-Domäne

Der *Dicer in vitro* Assay (DIVA) zeigt Eigenschaften, die mit Charakteristika der RNaseIII-Domänen von *Dicer* und bakteriellen RNaseIII-Enzymen korrelieren. Dort ist die metallkatalysierte Hydrolyse der dsRNA abhängig von Mg^{2+} oder Mn^{2+} (46). Das bivalente Kation wird im katalytischen Zentrum der RNaseIII koordiniert und dient als Nukleophil bei der Hydrolyse der Phosphodiesterbindung (46,120,121). Im DIVA konnte nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit von Mg^{2+} ebenfalls essentiell für die Prozessierung von dsRNA ist (Abbildung 8). So kann in Abwesenheit von Mg^{2+} keine DIVA-Aktivität detektiert werden. Darüber hinaus zeigen Titrationsexperimente eine Konzentrationsabhängigkeit von Mg^{2+} , das wie bei RNaseIII-Enzymen durch Mn^{2+} ersetzt werden kann (Abbildung 8).

Die Abhängigkeit von bivalenten Kationen ist jedoch kein sehr spezifisches Kriterium, da andere RNasen (wie z.B. RNaseHI, RNaseE oder RNaseII) ebenfalls Mg^{2+} für die Hydrolyse der RNA benötigen (47). Dagegen zeigen die Prozessierungsprodukte von RNaseIII-Enzymen (wie z. B. siRNAs) charakteristische Eigenschaften, die letztendlich zu der Identifizierung von *Dicer* in

Drosophila führten (25). Nach der Prozessierung von dsRNA durch RNaseIII entstehen weitgehend doppelsträngige RNAs, die an ihrem 3'-Ende einzelsträngige Überhänge von 2 nt aufweisen. Während an den terminalen 3'-Positionen Hydroxylgruppen lokalisiert sind, sind die basengepaarten 5'-Enden phosphoryliert (46,47). Für den Initiationsschritt in *T. brucei* konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsprodukte des DIVAs vergleichbare Eigenschaften mit siRNAs besitzen. So sind *sense*- und *antisense*-RNA in den Reaktionsprodukten nachweisbar (Abbildung 11). Darüber hinaus weist deren Resistenz gegenüber einzelstrangspezifischen Nukleasen auf eine doppelsträngige Struktur hin (Abbildung 11). Bei der Frage nach den terminalen Strukturen konnte gezeigt werden, dass nur das 5'-Ende phosphoryliert ist und einzelsträngige Überhänge von 1 bis 2 nt existieren (vgl. 3.1.3.1 und Abbildung 12). Jedoch wurde in dem *in vitro* Assay nicht die Position dieser Überhänge bestimmt. Einen indirekten Hinweis, dass die Überhänge am 3'-Ende von siRNAs in *T. brucei* lokalisiert sind, stammen von Transfektionsexperimenten. Hier konnte gezeigt werden, dass synthetische siRNAs (si315 und si956) mit RNaseIII-kompatiblen Enden die Funktion der Dicer-Produkte *in vivo* imitieren können (vgl. 3.2.1.2 und 3.2.1.3).

Insgesamt weisen die Charakteristika der Reaktionsprodukte und die Abhängigkeit des Initiationsschrittes von bivalenten Kationen auf die Beteiligung eines RNaseIII-Enzyms hin.

4.1.1.2 PAZ-Domäne

Neben der RNaseIII-Domäne gibt es in Dicer noch die PAZ-Domäne, deren Funktion jedoch noch nicht eindeutig geklärt wurde. So konnte in strukturellen Analysen für die PAZ-Domäne aus Argonaute-Proteinen eine hydrophobe Bindetasche identifiziert werden (1,62). Diese wird mit der Erkennung von 2 nt 3'-Überhängen in Verbindung gebracht, wie sie bei der Dicer-katalysierten Prozessierung von dsRNA entstehen. Da humanes Dicer präferentiell die Enden des dsRNA-Substrates spaltet (50), wird derzeit vermutet, dass diese Domäne die Bindung Dicers an die dsRNA-Enden mediiert (57).

Vergleichbare Eigenschaften für den Initiationsschritt in *T. brucei* weisen ebenfalls auf die Existenz dieser Domäne in Dicer hin. So wurde in dem Zeitverlauf des DIVAs gezeigt, dass sukzessiv verkürzte dsRNA in Abhängigkeit der Zeit auftreten (Abbildung 7). Dieser Prozessierungsmodus korreliert ebenfalls mit einer präferentiellen Bindung und Hydrolyse des dsRNA-Substrates an seinen Enden. Da siRNAs in *T. brucei* vermutlich

RNaseIII-kompatible Enden aufweisen (vgl. 4.1.1.1), sollte das dsRNA-Substrat nach dieser Reaktion ebenfalls terminale 2 nt 3'-Überhänge aufweisen, die von einer putativen PAZ-Domäne erkannt werden könnten. Ein weiteres Argument für die Existenz einer PAZ-Domäne stammt aus dem Vergleich von RNAi-Komponenten in anderen Organismen. Es zeigt sich, dass die PAZ-Domäne nicht nur für Dicer, sondern auch für RNAi-Komponenten der Argonaute-Proteinfamilie charakteristisch ist (25,44,59). In *T. brucei* konnte ebenfalls die PAZ-Domäne in der essentiellen RNAi-Komponente TbAgo1 nachgewiesen werden, die homolog zu Argonaute-Proteinen anderer Organismen ist (109).

4.1.1.3 ATPase/Helikase-Domäne

Dicer gehört zu der Klasse 3 der RNaseIII-Superfamilie und unterscheidet sich von eukaryotischen RNaseIII-Enzymen der Klasse 2 durch die Existenz einer DExD/H-Box Helikase/ATPase-Domäne (vgl. 1.2.2). Die präzise Funktion der Helikase ist bisher noch nicht bekannt (50,57). Für Invertebraten konnte jedoch gezeigt werden, dass ATP essentiell für den Initiationsschritt ist (5,25,41,68). Es wird daher vermutet, dass die ATPase/Helikase-Domäne an der Entwindung der dsRNA und der Translokation von Dicer beteiligt ist (25,67,68).

Bei der Charakterisierung der DIVA-Aktivität wurde zwar keine Helikaseaktivität nachgewiesen, jedoch zeigen Versuche mit ATP und seinen Derivaten Eigenschaften, die mit einer möglichen Helikaseaktivität vereinbar sind. So ist die dsRNA-Prozessierung im DIVA abhängig von ATP (Abbildung 9). Weiterführend Experimente mit ATP-Analoga zeigen, dass die Existenz einer hydrolysierbaren Phosphoanhydridbindung für die DIVA-Reaktion entscheidend ist (Abbildung 9). So konnte ein positiver Einfluss auf die DIVA-Aktivität ausschließlich für die ATP-Derivate nachgewiesen werden, die mindestens eine Phosphoanhydridbindung enthalten (ATP- γ -S und AMP-CPP). Diese Tatsache ist konsistent mit der Funktion von DEAD-Box Helikasen, da deren Translokation abhängig von der Hydrolyse der Phosphoanhydridbindung in ATP ist (122). Weitere Versuche mit dem DIVA zeigen, dass ATP durch dNTP und NTP substituierbar ist. So haben unterschiedliche Basen oder eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleosidtriphosphate keinen negativen Einfluss auf die DIVA-Aktivität. Die Substituierbarkeit von ATP durch dNTP konnte ebenfalls für andere DEAD-Box Helikasen und für eine RNA-Helikaseaktivität in mitochondrialen Extrakten von *T. brucei* gezeigt werden (123-125).

Neben Nukleosidtriphosphaten wurde ebenfalls ein positiver Einfluss von ADP auf die DIVA-Aktivität festgestellt (Abbildung 9). Diese Tatsache spricht zunächst gegen eine Helikasefunktion im DIVA, da die Hydrolyse von ATP essentiell für die Entwindung der dsRNA ist (122). Jedoch konnte der gleiche Effekt für eine Helikaseaktivität in mitochondrialen Extrakten von *T. brucei* detektiert werden (123). Eine mögliche Begründung für diese Tatsache ist eine Disproportionierungsreaktion ($2 \text{ ADP} \rightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$) im zytoplasmatischen Lysat, die das benötigte Nukleosidtriphosphat bereitstellen würde. Diese Reaktion könnte durch eine Adenylatkinase katalysiert werden. Beispiele für in Frage kommende Adenylatkinasen in *T. brucei* sind TbADKA und TbADKB, die am Flagellum lokalisiert wurden (126). Diese oder andere Adenylatkinasen könnten die zytoplasmatischen Extrakten nach dem Zellaufschluss kontaminieren und somit die Disproportionierungsreaktion katalysieren.

Zusammenfassend sind die gezeigten Daten vereinbar mit einer Helikasefunktion während der Prozessierung von dsRNA durch Dicer. Jedoch kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass ATP für die Funktion einer anderen Domäne benötigt wird. Darüber hinaus wäre auch eine Dicer-unabhängige Reaktion denkbar, die ATP-abhängig ist und einen indirekten Einfluss auf die DIVA-Reaktion hat.

4.1.1.4 Vermutungen über die Struktur des Dicer-Orthologs

Die dargestellten biochemischen Charakterisierungen konnten konservierte Eigenschaften der Dicer-Reaktion in *T. brucei* nachweisen. Obwohl die Daten für die Existenz der konservierten Domänen sprechen, stellt sich die Frage, warum Dicer in *T. brucei* bisher nicht über Homologievergleiche identifiziert worden ist. Unter der Berücksichtigung der konservierten biochemischen Charakteristika des Initiationsschrittes sind zwei Begründungen denkbar:

- 1) Dicer besitzt eine konservierte Domänenstruktur, jedoch ist die vollständige Sequenz nicht in der Genomdatenbank vorhanden (87). In diesem Fall würde eine Identifizierung durch Homologievergleiche mit der gesamten Sequenz von *Dicer*-Orthologen schwierig. Ein Indiz für diese Erklärung kommt von der Abschätzung der apparenten molekularen Masse, die mit Hilfe des DIVAs in einer Gelfiltration ermittelt wurde. Der Wert von 207 kDa liegt dabei in dem Bereich von Dicer-Proteinen anderer Organismen (vgl. Abbildung 10) und wäre vereinbar mit einer konservierten Domänenstruktur Dicers.

- 2) Eine alternative Möglichkeit könnte darin liegen, dass o. g. Domänen zwar an dem Initiationsschritt beteiligt sind, jedoch zu unterschiedlichen Proteinen gehören. Die dsRNA-Prozessierung würde hier durch die konzertierte Aktion dieser Proteine katalysiert werden. Wie im ersten Fall wäre eine Identifizierung durch Homologievergleiche schwierig. Eine derartige Verteilung von Domänen konnte für die beiden Dicer-Proteine in *Dictyostelium discoideum* gezeigt werden (55). Dabei ist die N-terminale Helikasedomäne vermutlich Teil der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) RrpA, die für RNAi eine essentielle Funktion besitzt (55). Ein Hinweis für die Beteiligung mehrerer Proteine am Initiationsschritt von *T. brucei* kommt durch die Identifizierung einer putativen Helikase in der Genomdatenbank (GeneDB, Zugangscode: Tb07.13M20.480). Diese weist wie humanes Dicer eine DEAD/H-Domäne (Pfam Datenbank: PF00270) und eine Helikase-konservierte C-terminale Domäne (Pf00271) auf. Obwohl keine RNaseIII- oder PAZ-Domänen identifizierbar sind, wird in dem Datenbankeintrag dieser Helikase eine Identität von mindestens 30% zu Dicer aus *C. elegans* (30%), der Maus (39%) und dem Menschen (31%) angegeben. Weiterführende Homologievergleiche (BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*) mit der Datenbank GenBank (NCBI) führen zu der Identifizierung der zuvor erwähnten RdRP RrpA aus *Dictyostelium discoideum*. Dabei zeigen die 500 Aminosäuren des C-Terminus 24% identische und 44% ähnliche Aminosäuren (Erwartungswert: $2 \cdot 10^{-23}$).

Basierend auf den hier dargestellten Charakterisierungsdaten müssen beide Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Jedoch kann bis zu der endgültigen Identifizierung von Dicer in *T. brucei* die Existenz divergenter Domänen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Die Identifizierung mit Hilfe des DIVAs und biochemischer Separierungsmethoden erwiesen sich in dieser Arbeit als kritisch (vgl. 3.1.4), da die Aktivität eine geringe Stabilität aufwies (Abbildung 13). Eine Alternative könnte jedoch durch die Anwendung des RNAi *in vivo* Systems in Form einer RNAi-library bestehen, die im Abschnitt 4.4 diskutiert wird.

4.1.2 siRNAs sind Intermediate des RNAi-Prozesses in *T. brucei*

Über siRNAs in *Trypanosoma brucei* ist derzeit bekannt, dass diese eine Länge von 24 bis 26 nt aufweisen und *in vivo* nach der Transfektion von dsRNA akkumulieren (6). Abgesehen von der Länge sind jedoch keine weiteren strukturellen Eigenschaften der siRNAs untersucht worden. Unter

Berücksichtigung eines fehlenden *Dicer*-Orthologs in *T. brucei* ist daher unklar, ob siRNAs die Eigenschaften prototypischer siRNAs besitzen und Intermediate des RNAi-Mechanismus' sind.

4.1.2.1 Strukturelle Eigenschaften der siRNAs

Für die strukturelle Untersuchung der siRNAs in *T. brucei* wurden die Prozessierungsprodukte des DIVAs charakterisiert. Dabei zeigen die siRNAs mit den *in vivo* detektierten siRNAs eine vergleichbare Verteilung (Daten nicht gezeigt) und Länge mit 23 – 27 nt (Abbildung 11). Somit scheint die Prozessierung von dsRNA *in vivo* und *in vitro* von der gleichen Enzymaktivität katalysiert zu werden. Die Länge der siRNAs weicht um 3 - 5 nt von siRNAs aus *Drosophila*, (21-22 nt), *C. elegans* (23 nt), Pflanzen (21-23 nt) und der Maus (21-22 nt) ab (5-8,10,34,37,39,127,128). Nach dem Modell von Zhang *et al.* (2004) wird vorgeschlagen, dass die Länge der siRNAs durch den Abstand zwischen der PAZ-Domäne und den RNaseIII-Domänen auf der dsRNA determiniert wird (57). Unter Berücksichtigung der konservierten Eigenschaften des DIVAs bezüglich der RNaseIII- und der PAZ-Domäne (vgl. 4.1.1.1 und 4.1.1.2) könnte der größere Abstand zwischen beiden Domänen die Abweichung der siRNA-Länge erklären. Im Falle einer divergenten Struktur (z. B. nur eine RNaseIII-Domäne) wäre auch eine Dimerisierung Dicers als Grund für die abweichende Länge der siRNAs denkbar. So liegt die *E. coli* RNaseIII unter *in vitro* Bedingungen ebenfalls als Dimer vor und die Produkte weisen eine Länge von 9 - 11 nt auf (46,57). Neben der Länge wurden weitere strukturelle Eigenschaften der siRNAs untersucht. Dabei weisen diese konservierte Eigenschaften hinsichtlich ihrer Doppelsträngigkeit, des Phosphorylierungsstatus' und der terminalen Überhänge auf (vgl. Abschnitt 4.1.1.1 und Abschnitt 3.1.3).

4.1.2.2 siRNAs als Intermediate des RNAi-Mechanismus'

Der erste Hinweis darauf, dass siRNAs Intermediate des RNAi-Mechanismus' in *T. brucei* sind, ergeben sich aus den Ergebnissen der Transfektions-experimente mit synthetischen siRNAs. Dabei wurde die Ausbildung eines spezifischen RNAi-Phänotyps beobachtet (Abbildung 19A). Weiterführende *Northern*-Analysen zeigten zudem, dass der RNAi-Effekt mit einer spezifischen Reduktion der korrespondierenden mRNA koinzidiert (Abbildung 19C). So kann 18 Stunden nach der Transfektion von siRNA si315 und si956 eine Abnahme von mehr als 50% festgestellt werden. Jedoch stellt die spezifische mRNA-Reduktion nur ein notwendiges aber nicht hinreichendes

Kriterium für den Nachweis dar, dass siRNAs Intermediate des RNAi-Mechanismus' sind. Aufgrund dieser Daten kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Reduktion der mRNA auf transkriptioneller Ebene begründet liegt. So ist z. B. für *Schizosaccharomyces pombe* bekannt, dass siRNAs auch im transkriptionellen *silencing* eine Rolle spielen (30). Den Nachweis auf posttranskriptioneller Ebene ermöglichte erst die Etablierung des RISC *in vitro* Assays (RIVA). In einem Zeitverlauf konnte gezeigt werden, dass siRNAs als Intermediate an der Spaltung der mRNAs beteiligt sind. Dabei ist nur in Anwesenheit der siRNA die positionsspezifische Spaltung der mRNA zu beobachten (Abbildung 20).

4.1.3 Zusammenfassung

Ingesamt zeigen die *in vivo* und *in vitro* Experimente, dass siRNAs eine konservierte Struktur aufweisen und als Intermediate des RNAi-Mechanismus' die mRNA-Spaltung medieren. Die biochemische Charakterisierung des Initiationsschrittes und die strukturelle Analyse seiner Produkte (siRNAs) weisen auf die Funktion folgender Domänen im Initiationsschritt hin: RNaseIII-Domäne, PAZ-Domäne und ATP/Helikasedomäne. Ob Dicer als einzelnes Protein mit konservierter Domänenstruktur existiert oder die Domänen Bestandteile mehrerer interagierender Proteine sind, kann derzeit trotz biochemischer Charakterisierungen nicht eindeutig geklärt werden

4.2 Der Effektorschritt zeigt RISC-verwandte Eigenschaften

Vergleicht man den RNAi-Mechanismus von *C. elegans* mit dem höherer Eukaryoten, so zeigen sich divergente Eigenschaften. In *Drosophila* und Säugetieren wird die mRNA durch einen RISC-katalysierten Mechanismus degradiert (26,74). Dagegen wird der Effektorschritt in *C. elegans* durch eine „degenerative PCR“ (99) mediiert (vgl. 1.4), in der Dicer und eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) involviert sind (91,95,96). Für *Trypanosoma brucei* ist derzeit unklar, über welchen Mechanismus der RNAi-Effektorschritt realisiert wird.

4.2.1 siRNAs mediierten die sequenz- und positionsgenaue Spaltung der mRNA

Für die Charakterisierung des Effektorschrittes wurde ein *in vitro* Assay etabliert (RIVA), der die mRNA-Spaltung in zytoplasmatischem Extrakt rekapituliert. Dabei zeigt der RIVA Eigenschaften, die auf einen RISC-katalysierten Effektorschritt hindeuten. So kann in einem Zeitverlauf (Abbildung 20) die positionsgenaue Spaltung der mRNA in Anwesenheit der siRNA nachgewiesen werden. Die Größe des detektierten Spaltproduktes entspricht dabei dem 5'-Fragment, das nach einer RISC mediierten Spaltung erwartet werden würde (19,38). Die Abhängigkeit der Reaktion von siRNAs wurde in einem Titrationsexperiment demonstriert, in dem variierende Konzentrationen von siRNA eingesetzt wurden. Dabei korrelieren steigende Konzentrationen an siRNA mit einer zunehmenden Aktivität der mRNA-Spaltung (Abbildung 21A). Darüber hinaus wurde auch die Spezifität der Reaktion bezüglich der siRNA-Sequenz nachgewiesen. So konnte die Spaltung der mRNA durch steigende Konzentrationen an unspezifischer siRNA kompetiert werden (Abbildung 21B).

4.2.2 Der Effektorschritt wird nicht durch eine RdRP katalysiert

In der „degenerativen PCR“ von *C. elegans* hybridisiert einer der beiden siRNA-Stränge mit der mRNA und dient als *Primer* für die Synthese des komplementären Stranges (91,96). Die Polymerisation wird an der 3'-Hydroxylgruppe des siRNA-Stranges initiiert und in 5'-3'-Richtung fortgesetzt (91,99). Die resultierende dsRNA (mit der mRNA als einer der beiden Stränge) wird anschließend durch Dicer degradiert (91,96).

Übertragen auf den RIVA würde das bedeuten, dass das radioaktiv markierte 5'-Fragment in eine dsRNA durch die RdRP integriert werden würde. Da die Bedingungen im RIVA mit dem Dicer *in vitro* Assay weitgehend übereinstimmen, sollte die Akkumulation von siRNAs detektierbar sein. Die Charakteristika des Effektorschrittes weisen jedoch Eigenschaften auf, die gegen eine „degenerative PCR“ sprechen. So zeigt der Zeitverlauf des RIVAs die Akkumulation eines stabilen 5'-Fragmentes (Abbildung 20). Darüber hinaus können auch keine siRNAs mit 24-27 nt detektiert werden, obwohl vergleichbar mit dem DIVA in Abbildung 11 einer der beiden dsRNA-Stränge radioaktiv markiert sein sollte. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die RdRP unter diesen *in vitro* Bedingungen inaktiv ist. Es gibt jedoch weitere Argumente, die gegen die Aktivität einer RdRP im Effektorschritt von *T. brucei* sprechen:

- 1) Im Datenbankvergleich mit der Genomdatenbank (GeneDB) konnte bisher keine Sequenz für ein *RdRP*-Ortholog identifiziert werden (87).
- 2) Eine Konsequenz der RdRP-Aktivität ist das so genannte transitive RNAi (91). Damit wird der Effekt bezeichnet, dass siRNAs auch aus anderen Bereichen der eigentlichen Zielregion der dsRNA detektiert werden können. In *T. brucei* zeigt jedoch die Sequenzierung von siRNAs, dass lediglich Sequenzen innerhalb der dsRNA nachweisbar sind (6).
- 3) In der Datenbank von *T. brucei* können Proteine identifiziert werden, die homolog zu RISC-Komponenten anderer Organismen sind. So weist TbAgo1 als essentielle RNAi-Komponente (109) Homologien zu Slicer (Ago2) auf (vgl. Abschnitt 4.2.5). Darüber hinaus zeigen Datenbankvergleiche ebenfalls Homologien zu der RISC Komponente Tudor-SN aus *Drosophila* (siehe dazu 4.2.3).

4.2.3 Tudor-SN als putative Exonuklease des RISCs?

Im Gegensatz zu einem stabilen 5'-Fragment wurde kein 3'-Fragment im RIVA detektiert. Folglich gibt es zwei unterschiedliche Degradationsmodi, die ein stabiles 5'-Fragment mit der erwarteten Größe und die Abwesenheit eines 3'-Fragmentes erklären: Im ersten Fall könnte eine Exonuklease das 3'-Fragment bis zum siRNA:mRNA Hybrid degradieren. Dagegen würde im zweiten Fall der endonukleolytische Schnitt die exonukleolytische Degradation des 3'-Fragmentes initiieren. Der zweite Degradationsmodus wäre damit konsistent mit einem RISC-katalysierten Effektorschritt (81,82,86).

Vergleicht man die Ergebnisse des RIVAs mit *in vitro* Assays aus *Drosophila*, so wird dort ebenfalls nur ein stabiles 5'-Fragment detektiert (19,20,38,41,55,68,76,85). Erst die Hemmung einer sequenzspezifischen Ribonuklease ermöglicht die Detektion beider Fragmente, so dass eine endonukleolytische Spaltung der mRNA durch den RISC nachgewiesen werden konnte (81,82). Es wird derzeit vermutet, dass die RISC-Komponente und Exonuklease Tudor-SN (*flybase*: CG7008) an der Degradation des 3'-Fragmentes beteiligt sein könnte (86). Ein homologes Protein (GeneDB Zugangscode: Tb11.01.5780) konnte ebenfalls in der Genomdatenbank von *T. brucei* detektiert werden (87). In Homologievergleichen mit GenBank (NCBI) wurden 23% identische und 41% ähnliche Aminosäuren identifiziert (Erwartungswert: $2 \cdot 10^{-43}$). Ob dieses Protein wirklich an der Destabilisierung des 3'-mRNA Fragments beteiligt ist, könnte in einem RIVA nachgewiesen werden. Dabei würde man Zellextrakte verwenden, die von *Tudor-SN knock out* Mutanten oder von Zellen nach einem entsprechenden *knock down* stammen. Ein stabiles 3'-Produkt würde die Beteiligung von *Tudor-SN* am RNAi-Mechanismus von *T. brucei* nachweisen.

4.2.4 Terminale siRNA-Sequenzen determinieren die Effizienz der mRNA Spaltung

Für den RISC katalysierten Effektorschritt ist bekannt, dass siRNAs nach ihrer Inkorporation entwunden werden und nur einer der beiden siRNA-Stränge mit dem RISC assoziiert bleibt (2,68,74,75). Dabei determinieren die terminalen Stabilitäten des Doppelstranges, welcher der beiden siRNA-Stränge präferentiell im RISC verbleibt und die Erkennung der Zielsequenz mediert [(68,75), vgl. 1.3.2]. Als Folge dessen wird entweder die *sense*- oder die *antisense*-mRNA bevorzugt durch den RISC gespalten (75). Auch im RIVA gibt es Hinweise dafür, dass siRNAs entwunden werden und nur ein Strang die Erkennung und Spaltung der Zielsequenz mediert. So konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von siRNA si315 nur die *sense*-jedoch nicht die *antisense*-mRNA gespalten wird (Abbildung 22). Dabei deuten die berechneten Profile der internen thermodynamischen Stabilität (IT-Profile) von si315 auf eine höhere Stabilität des 5'-Endes¹ im Vergleich zum 3'-Ende hin (Abbildung 16). Diese Beobachtung ist konsistent mit den Eigenschaften, die für siRNAs in *Drosophila* nachgewiesen wurden. Hier konnte gezeigt werden, dass ein hoher G:C Gehalt am 5'-Ende der siRNA mit einer höheren Spaltungseffizienz der mRNA koinzidiert (1.3.2). Dagegen

föhrte die Erniedrigung der Stabilität durch die Substitution der G:C Basenpaare durch G:U Basenpaare zu der präferentiellen Spaltung der *antisense*-mRNA (75).

Darüber hinaus konnte in höheren Eukaryoten der Zusammenhang zwischen terminalen Stabilitäten und der *knock down* Effizienz von siRNAs *in vivo* gezeigt werden. Dabei wird RNAi sehr effizient durch die siRNAs ausgelöst, deren IT-Profile ebenfalls auf eine höhere Stabilität des 5'-Endes gegenüber dem 3'-Ende hindeuten (2). In *T. brucei* zeigen die Transfektionsexperimente mit synthetischen siRNAs übereinstimmende Ergebnisse. So lösen die siRNAs (si315 und si956) mit vergleichbaren Profilen einen effizienten *knock down* des α -Tubulin Gens aus (Abbildung 19). Dagegen konnte im Fall von siRNA si329 mit einem inversen IT-Profil kein RNAi-Phänotyp detektiert werden. Lediglich auf mRNA Ebene wurde eine Reduktion der α -Tubulin mRNA um 14% nachgewiesen (Abbildung 19). Die partielle Degradation der mRNA könnte darauf zurückzuführen sein, dass nur ein geringer Anteil der Effektor Komplexe mit dem *antisense*-Strang der siRNAs assoziiert bleiben. Folglich wird im Vergleich zu den anderen beiden siRNAs nur ein geringerer Anteil an mRNAs erkannt und degradiert.

In *Drosophila* wird derzeit vermutet, dass die RISC-Komponente Armitage an der Entwindung der siRNA beteiligt ist (77). Es wird davon ausgegangen, dass die Helikase den siRNA-Doppelstrang von der Seite her entwindet, der durch einen niedrigeren G:C-Gehalt eine geringe Stabilität aufweist (75). Ausgehend von dieser initialen Lokalisation der Helikase wird determiniert, welcher der beiden Stränge in dem RISC verbleibt und die Erkennung des mRNA-Substrates mediiert (75,77). Obwohl die o. g. Ergebnisse mit einer Entwindung des siRNA-Stranges durch eine Helikase in *T. brucei* vereinbar sind, wurde bisher noch kein *Armitage*-Homolog in der Genomdatenbank nachgewiesen.

¹ Es wird sich stets auf den *sense*-Strang bezogen, der homolog zu der Zielsequenz der mRNA ist.

4.2.5 TbAgo1 als putatives Slicer?

Trotz Identifizierung der essentiellen RNAi-Komponente TbAgo1 konnte deren präzise Funktion im RNAi-Mechanismus bisher nicht herausgefunden werden. Da keine siRNAs nach der Transfektion von dsRNA in TbAgo1 *knock out* Mutanten detektierbar sind, wird eine Funktion in der Prozessierung oder der Stabilisierung von siRNAs diskutiert (109). Datenbankvergleiche zeigen,

dass TbAgo1 Homologien mit anderen Argonaute-Proteinen aufweist (109). Die Funktion eines dieser Proteine wurde kürzlich entschlüsselt. Dabei konnte humanes Ago2 als katalytische Komponente Slicer identifiziert werden (1,73), die die endonukleolytische Spaltung der Ziel-mRNA im RISC katalysiert.

Im Fall von TbAgo1 gibt es einige Erkenntnisse, die mit der Funktion von Slicer in einem RISC von *T. brucei* vereinbar sind. Für die Funktion Slicer's sind die PAZ- und die Piwi-Domäne essentiell. Während die PAZ-Domäne die Erkennung und die Bindung von siRNAs mediiert (62-66) katalysiert die Piwi-Domäne die endonukleolytische Spaltung der mRNA (1,73). Im Vergleich dazu weist TbAgo1 ebenfalls eine PAZ- und Piwi-Domäne auf. Die siRNA-bindende Funktion der PAZ-Domäne korreliert mit der Assoziation, die zwischen siRNAs und TbAgo1 nachgewiesen werden konnte (109). Darüber hinaus zeigen *knock out* Mutanten kein funktionelles RNAi in *T. brucei* (109). Diese Eigenschaft ist konsistent mit der katalytischen Funktion Slicers im Effektorschritt. Hier führten Punktmutationen in der Piwi-Domäne ebenfalls zu einer Inhibition des RNAi-Mechanismus' (73). Darüber hinaus gibt es einen Hinweis, der für die Lokalisation von TbAgo1 im RISC spricht. So konnte wie für den RISC in *Drosophila* eine Interaktion mit Ribosomen nachgewiesen werden (87,108,109).

Falls TbAgo1 die katalytische Komponente des RISCs in *T. brucei* ist, so stellt sich die Frage, warum ein *knock out* von TbAgo1 zu einer Reduktion des siRNA-Niveaus in den Zellen führt. Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache ist eine Degradation der siRNAs nach ihrer Prozessierung. So zeigt die Kinetik im Zeitverlauf des DIVAs (Abbildung 7), dass sich das siRNA-Niveau nach ca. 60 Minuten auf einen Wert von ca. 14% stabilisiert. Dagegen wird das dsRNA-Substrat während der 180 Minuten kontinuierlich abgebaut. Ein unspezifischer Abbau des dsRNA-Substrates ist vermutlich nicht der Grund dieser unterschiedlichen Kinetiken, da Inkubationen in Abwesenheit von ATP oder Mg^{2+} zu keinem vergleichbaren Abbau der dsRNA führen (Daten nicht gezeigt). So könnte der Grund für die unterschiedlichen Kinetiken die Degradation der siRNAs sein, die nach 60 Minuten mit einer gleichen Rate wie die siRNA-Prozessierung durch Dicer abläuft. Die Konsequenz bei einem *knock out* von TbAgo1 wäre, dass keine siRNAs über die PAZ-Domäne von TbAgo1 gebunden werden. Dadurch könnten diese nicht in den RISC inkorporiert werden und wären damit ungeschützt vor dem Abbau.

Ob TbAgo1 wirklich an der Prozessierung der siRNAs beteiligt ist, könnte durch Transfektionsexperimente mit siRNAs in *knock out* Mutanten nachgewiesen werden. In diesem Fall sollte ein RNAi-Effekt nachweisbar sein. Ist TbAgo1 dagegen die katalytische Komponente des RISCs, so könnte dieses mit Hilfe des etablierten RISC *in vitro* Assays herausgefunden werden. In diesem Fall sollte der Extrakt von TbAgo1 *knock out* Mutanten keine RISC-Aktivität aufweisen. Weiterführende Aktivitätsstudien könnten mit Lysaten aus TbAgo1 *knock out* Mutanten durchgeführt werden, die eine TbAgo1-Mutante mit Punktmutationen an konservierten Positionen der Piwi-Domäne exprimieren.

4.2.6 Modell des Effektorschrittes in *T. brucei*

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Effektorschritt in *T. brucei* die Eigenschaften einer RISC-katalysierten Reaktion rekapituliert. Ausgehend von den Charakteristika des RISCs in *Drosophila* und den dargestellten Ergebnissen aus *in vitro* und *in vivo* Experimenten, wird folgendes Modell vorgeschlagen:

Die siRNAs werden nach ihrer Prozessierung durch Dicer in den RISC inkorporiert und vermutlich durch die PAZ-Domäne der RISC-Komponente TbAgo1 gebunden. Beim Entwinden der siRNA (durch eine noch nicht identifizierte RNA-Helikase) bestimmt die terminale Stabilität der siRNA, welcher der beiden Stränge präferentiell mit dem RISC assoziiert bleibt. Dieser siRNA-Strang determiniert ob *sense*- oder *antisense* mRNA erkannt und durch TbAgo1 gespalten wird. Die abschließende exonukleolytische Degradation des 3'-Fragmentes wird durch das Tudor-SN katalysiert.

Implikationen aus diesem Modell ergeben sich bei der Anwendung von synthetischen siRNAs in RNAi-Experimenten. Für einen effizienten *knock down* sollten Sequenzen ausgesucht werden, deren IT-Profil mit denen funktioneller siRNAs aus höheren Eukaryoten übereinstimmen. Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, dass der Initiationsschritt und der RISC-katalysierte Effektorschritt konservierte *gene silencing* Mechanismen sind, die auch in höheren Eukaryoten konservierte Eigenschaften aufweisen.

4.3 Das RNAi *in vivo* System

Neben den *in vitro* Assays wurde ein *in vivo* System etabliert, mit dessen Hilfe putative RNAi-Komponenten auf ihre Beteiligung im RNAi-Mechanismus getestet werden können. Zum Nachweis dieser Komponenten wurde *Timer* als Reporter ausgewählt (117) und der RNAi-Phänotyp in einem *knock down* Experiment überprüft. Dabei zeigte *Timer* folgende Vorteile als RNAi-Reporter in *T. brucei*:

- 1) Die Expression von *Timer* ist anhand der Fluoreszenz einfach zu detektieren und durch FACS-Analysen quantifizierbar (Abbildung 24B, Abbildung 26A).
- 2) Der RNAi-Phänotyp ist bereits 24 Stunden nach der Induktion anhand der Reduktion von mehr als 30% der grünen Fluoreszenz nachweisbar (Abbildung 26A).
- 3) Im Unterschied zu dem *knock down* von α -Tubulin ist der RNAi-Phänotyp des *Timer*-Gens nicht letal für die Zellen.
- 4) *Timer* ist ein heterologes Gen, so dass ein Einfluss auf die Expression anderer Gene in *T. brucei* unwahrscheinlich ist. *Northern*-Analysen zeigen, dass der *knock down* von *Timer* zu keiner Änderung des α -Tubulin mRNA-Niveaus führt (Abbildung 24C).
- 5) Der *knock down* anderer Gene (wie z.B. α -Tubulin) führt zu keiner auffälligen Änderung der Fluoreszenz (Abbildung 24D).

Die Überprüfung des RNAi *in vivo* Systems mit TbAgo1 (Positivkontrolle) und α -Tubulin (Negativkontrolle) zeigt, dass die Identifikation von RNAi-Komponenten möglich ist (Abbildung 23). So kann nach der Induktion der erwartete Phänotyp detektiert werden. Dabei weisen die Zellen der Positivkontrolle eine 10-fach höhere Fluoreszenz im Vergleich mit den Zellen der Negativkontrolle auf (Abbildung 26). Abweichungen von den Erwartungen können jedoch im nicht-induzierten Zustand beobachtet werden. Dabei sollte als Folge des konstitutiven *knock down Timers* keine Fluoreszenz für die Positiv- und die Negativkontrolle nachweisbar sein. Jedoch zeigt die Positivkontrolle eine 10-fach höhere Fluoreszenz als die Zellen der Negativkontrolle (Abbildung 25B, Abbildung 26A).

Der einzige Unterschied zwischen den Zellen der Negativ- und der Positivkontrolle ist die induzierbare RNAi-Kassette (Abbildung 25A). Dabei

gibt es zwei Möglichkeiten, die die abweichenden Phänotypen für die Positiv- und die Negativkontrolle im nicht-induzierten Zustand erklären:

- 1) Eine alternative Rekombination der Plasmid-DNA in das *T. brucei* Genom: Dieser Fall wurde für das Plasmid pZJM in *T. brucei* berichtet, das dieselbe induzierbare RNAi-Kassette wie die Konstrukte des RNAi *in vivo* Systems enthält (119). Dabei findet die Rekombination nicht mit dem homologen rDNA-spacer statt, sondern mit dem Gen, dessen Sequenz in die induzierbare RNAi-Kassette integriert wurde. Im Fall der Positivkontrolle würde das TbAgo1-Gen disruptiert werden und somit der RNAi-Mechanismus seine Funktionalität verlieren (109). Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass nach Induktion von RNAi gegen TbAgo1 eine 2,2-fache Zunahme der Timer-mRNA detektierbar ist (Abbildung 26C, D).
- 2) Es findet auch im nicht-induzierten Zustand eine Hintergrundexpression der induzierbaren RNAi-Kassette statt: Für diese Erklärung spricht, dass eine Hintergrundexpression von dsRNA bereits für den Vektor pZJM beobachtet wurde, dessen induzierbare RNAi-Kassette in die Plasmide des RNAi *in vivo* Systems integriert ist [vgl. (111,118) und Abbildung 25A]. Ein Grund für die weniger stringente Regulation im Vergleich zu anderen induzierbaren Vektoren (116,129) könnte darin liegen, dass im pZJM-Vektor nur ein anstatt zwei Tetrazyklin-Operatoren die Transkription der T7-RNA-Polymerase reguliert (111). Im Fall der Positivkontrolle würde das zu einer konstitutiven Transkription von TbAgo1-dsRNA führen. Konsistent mit dieser Hypothese ist die 2,2-fache Zunahme der TbAgo1-mRNA 90 Stunden nach der Induktion mit Tetrazyklin (Abbildung 26C, D). In diesem Fall würde die Zugabe von Tetrazyklin zu einem verstärkten *knock down* von TbAgo1 führen und somit die mRNA von Timer stabilisieren. Im Gegensatz dazu ist phänotypisch nur ein Anstieg von 16% der grünen Fluoreszenz gegenüber der roten Fluoreszenz detektierbar (Abbildung 26B). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem mRNA-Niveau und der Fluoreszenz könnte die Abundanz der Timer mRNA sein. Die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase erlaubt in *T. brucei* eine ca. 500-fach stärkere Expression im Vergleich mit RNA-Polymerase II (130,131). So könnte im nicht-induzierten Zustand eine 2,2-fach geringere Konzentration der Timer-mRNA ausreichend sein, um eine vergleichbare Translationsrate zu gewährleisten.

Aber auch für die Zellen der Negativkontrolle existieren Hinweise für eine konstitutive Expression der α -Tubulin dsRNA. So ist 3 Monate nach der Etablierung dieser Zelllinie kein RNAi-Effekt (FAT-Phänotyp) detektierbar (Abschnitt 3.3.3, *Northern-Blot* Abbildung 26C). Eine RNAi-Defizienz wurde ebenfalls in Transfektionsexperimenten mit synthetischer α -Tubulin dsRNA beobachtet. Dabei führten vier aufeinander folgende Transfektionszyklen zu der Selektion RNAi-defizienter Zellen (111). Es ist bekannt, dass der *knock down* von α -Tubulin einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum hat, da die Zellen vor der Zytokinese im Zellzyklus arretieren (12). Im Fall der Negativkontrolle könnte die konstitutive Hintergrundexpression von α -Tubulin dsRNA ebenfalls zu einer Selektion RNAi-defizienter Zellen führen. So würde ein 10% schnelleres Wachstum der RNAi-defizienten Zellen rein rechnerisch zu einer mehr als 8000-fachen Anreicherung nach 3 Monaten führen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das RNAi *in vivo* System für den Nachweis essentieller RNAi-Komponenten mit Hilfe des Reporterproteins Timer geeignet ist. Die Fluoreszenz der Zellen im nicht-induzierten Zustand für RNAi-Komponenten ist vermutlich durch deren konstitutiven *knock down* erklärbar. Im Fall von TbAgo1 kann eine 10-fach höhere Fluoreszenz im Vergleich zu der RNAi-unspezifischen Kontrolle α -Tubulin detektiert werden. Dieser unterschiedliche Phänotyp kann für die Unterscheidung zwischen RNAi-Komponenten und unbeteiligten Proteinen herangezogen werden.

4.4 Perspektiven

Die Etablierung der *in vitro* und *in vivo* Assays eröffnet für die Zukunft die Möglichkeit, RNAi-Komponenten zu identifizieren und biochemisch zu charakterisieren. Diese Informationen würden weiteren Aufschluss über die Konservierung des RNAi-Mechanismus in *T. brucei* zulassen. Dabei könnte für die genomweite Identifizierung neuartiger RNAi-Komponenten das RNAi *in vivo* System mit einer RNAi-library gekoppelt werden. Das Prinzip der RNAi-library (Abbildung 27) beruht darauf, dass Kandidatengene durch genomweites RNAi identifiziert werden. Für die Herstellung der RNAi-library werden Genomfragmente in die induzierbare RNAi-Kassette von Plasmiden integriert. Dabei erfolgt die Integration zwischen zwei Tetrazyklin-induzierbare T7-Promotoren. Im Anschluss daran wird die RNAi-library in die prozyklische Rezipientenzelllinie 29-13 transfiziert und die Plasmide stabil in das Genom integriert. Im Idealfall ist jedes Gen des Genoms in der induzierbaren RNAi-Kassette mindestens einer Zelle repräsentiert. Nach der stabilen Integration in das Genom kann RNAi durch die Zugabe von Tetrazyklin induziert werden. Dadurch entsteht ein RNAi-Polymorphismus, der durch den *knock down* unterschiedlicher Gene hervorgerufen wird. Im nächsten Schritt werden Zellen mit gewünschtem Phänotyp selektiert. Ist man zum Beispiel an Genen interessiert, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind, so könnte man Zellen mit FAT-Phänotyp selektieren. Für die Identifizierung der beteiligten Gene wird das Genomfragment sequenziert, das in die induzierbare RNAi-Kassette der selektierten Zellen integriert wurde. Der abschließende Vergleich mit der *T. brucei* Genomdatenbank (GeneDB) kann dann Aufschluss über die Kandidatengene geben.

Die Einschränkung der RNAi-library ergibt sich durch den Selektionsschritt. So können nur Gene gefunden werden, deren *knock down* zu einem selektierbaren Phänotyp führt. Übertragen auf das RNAi *in vivo* System könnten RNAi-Komponenten durch die Selektion von fluoreszierenden Zellen identifiziert werden. In Abweichung zu der RNAi-library müssten dafür Genomfragmente in die induzierbare RNAi-Kassette des RNAi *in vivo* Systems integriert werden (Abbildung 25A). Nach der Induktion mit Tetrazyklin könnten die fluoreszierenden Zellen mit Hilfe eines FACS selektiert und putative RNAi-Komponenten identifiziert werden.

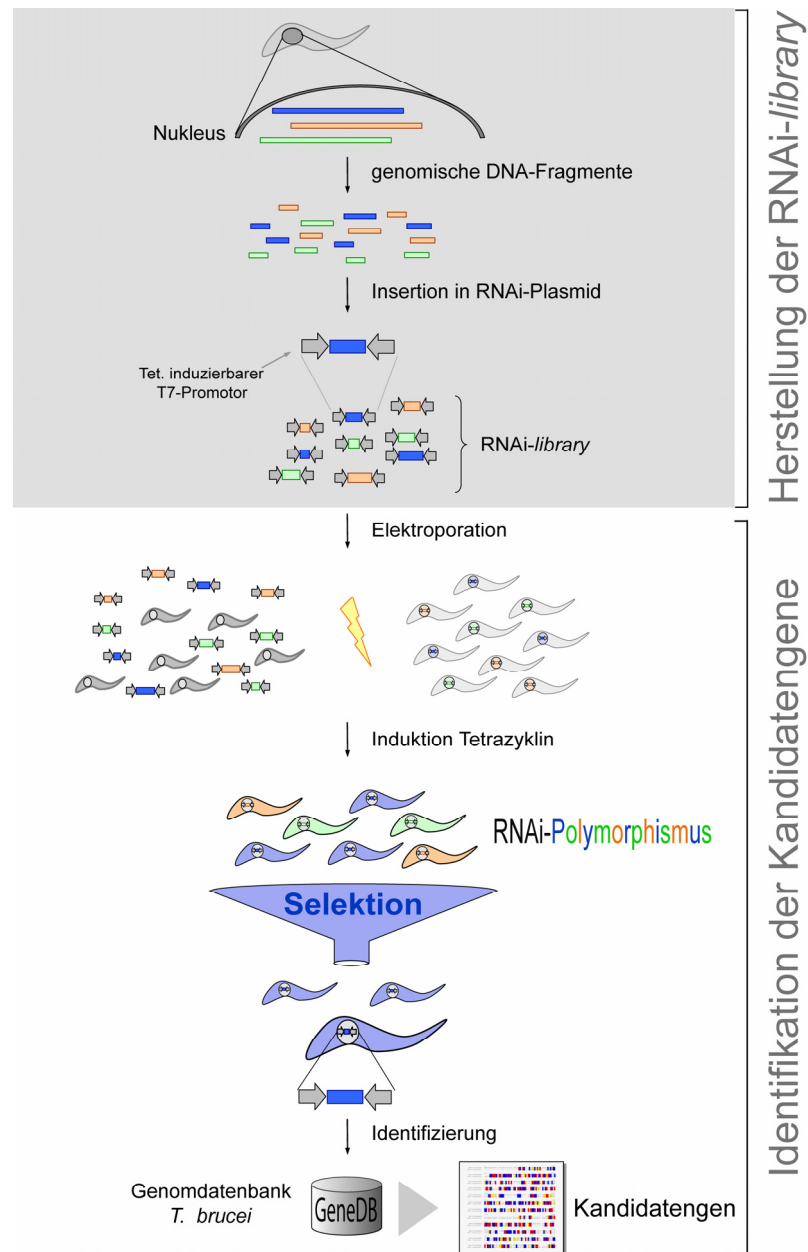


Abbildung 27. Das Prinzip der RNAi-library in *Trypanosoma brucei* – Die RNAi-library dient der genomweiten Identifizierung von Kandidatengenen. Für die Herstellung einer RNAi-library werden genomische DNA-Fragmente in RNAi-Plasmide inseriert. Dabei wird das genomische Insertionsfragment von zwei T7-Promotoren und Tetrazyklin Operatoren flankiert. Im Idealfall ist das gesamte Genom durch die RNAi-Plasmide repräsentiert. Für die Identifizierung der Kandidatengene werden die Plasmide in die Trypanosomenzelllinie 29-13 transfiziert, die die T7-RNA-Polymerase und den Tetrazyklin-Repressor konstitutiv exprimiert. Nach der stabilen Integration der Plasmid-DNA in das Genom wird RNAi durch Zugabe von Tetrazyklin (Tet.) induziert. In der nachfolgenden Selektion werden die Zellen isoliert, die einen Phänotyp aufweisen, der im Zusammenhang mit dem *knock down* des Kandidatengen steht. Für die Identifizierung wird die Sequenz des integrierten Genomfragmentes bestimmt und mit der Genomdatenbank von *T. brucei* abgeglichen.

Neben der Identifizierung von RNAi-Komponenten ist die Aufklärung ihrer Funktion wichtig. Die in dieser Arbeit etablierten Methoden bieten die Grundlage einer ganzheitlichen Identifizierung und Charakterisierung von RNAi-Komponenten (Abbildung 28). Diese kann in drei Schritten erfolgen:

- 1) Im ersten Schritt kann die **Identifikation** von Kandidatengenomen putativer RNAi-Komponenten auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen. Zum einen können homologe RNAi-Komponenten anderer Organismen über den Datenbankvergleich identifiziert werden. Diese könnten auf ihre Beteiligung im RNAi-Mechanismus durch das RNAi *in vivo* System getestet werden. Dagegen könnten neue RNAi-Komponenten durch die Anwendung der RNAi-*library* gefunden werden.
- 2) Nach der Identifikation einer putativen RNAi-Komponente (Gen X) folgt die **Klassifizierung**. Dabei soll herausgefunden werden, ob es sich bei dem Genprodukt X um eine Komponente des Initiationsschrittes oder des Effektorschrittes handelt. Diese Klassifizierung könnte durch die Elektroporation der siRNA si315 in einer *knock down* oder *knock out* Zelllinie für das Gen X erfolgen. Ist das Gen essentiell für den Initiationsschritt, sollte ein FAT-Phänotyp detektierbar sein. Dagegen sollte kein FAT-Phänotyp erwartet werden, falls es sich um eine Komponente des Effektorschrittes handelt.
- 3) Nach der Klassifizierung kann die biochemische **Charakterisierung** der Komponente mit Hilfe des DIVAs oder des RIVAs erfolgen. Dabei können Zelllysate von *knock out* Mutanten verwendet werden, in denen anstelle der putativen RNAi-Komponente das entsprechende Gen mit geeigneten Mutationen exprimiert wird.

Die Anwendung dieses Systems könnte mit den in der Genomdatenbank identifizierten putativen RNAi-Komponenten durchgeführt werden. Im Fall der Helikase (vgl. Abschnitt 4.1.1.4) könnte dabei gezeigt werden, ob der Initiationsschritt in *T. brucei* von dem höherer Eukaryoten abweicht. Dabei wäre es möglich, dass eine Helikase-Funktion des Initiationsschrittes durch eine individuelle RNAi-Komponente katalysiert wird.

Neben der Identifikation von RNAi-Komponenten ergeben sich noch weitere Perspektiven. Die Etablierung der effizienten Induktion von RNAi durch die Transfektion synthetischer siRNAs ermöglicht die einfache und schnelle Analyse von beliebigen Genen in *T. brucei*. Die derzeit hohen Kosten für die Synthese können durch die etablierte Methode der siRNA-Herstellung über

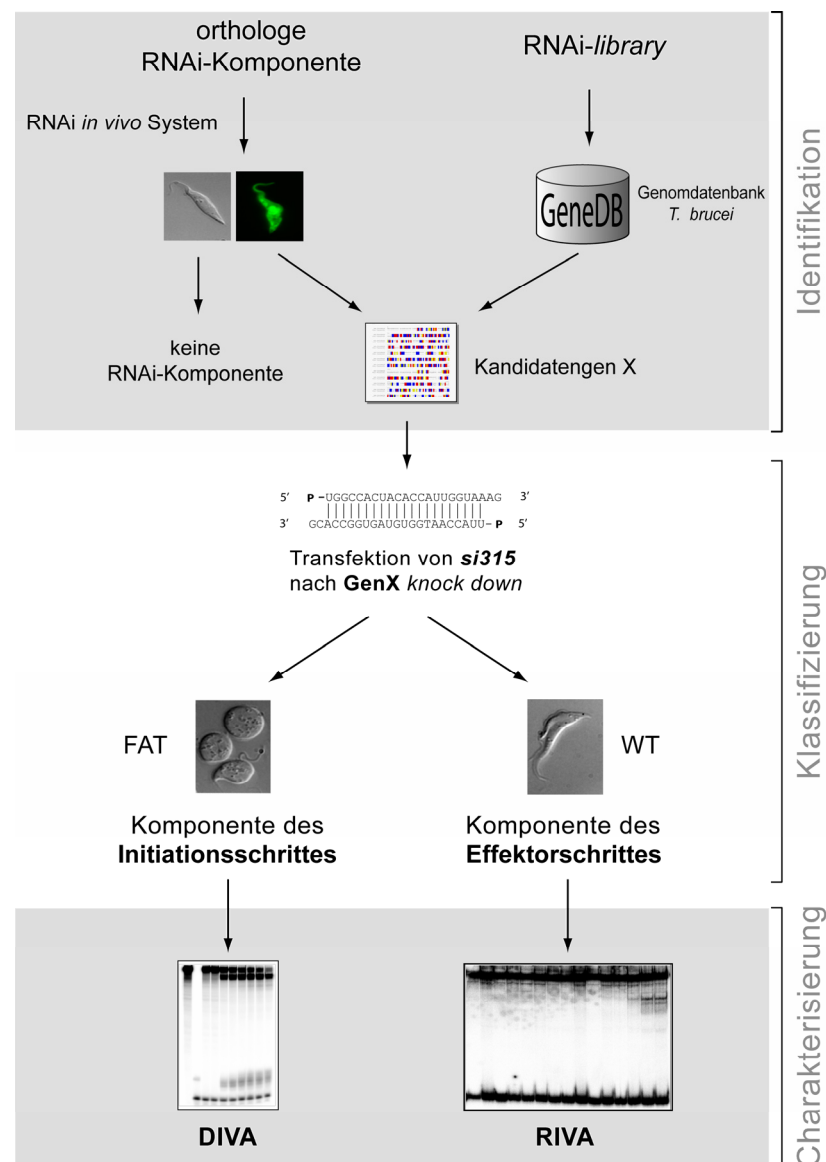


Abbildung 28. Identifizierung und Charakterisierung von RNAi-Komponenten – Die Abbildung zeigt die Anwendung der etablierten *in vitro* und *in vivo* Methoden für die ganzheitliche Identifizierung und Charakterisierung von RNAi-Komponenten. Für die Identifikation der Kandidatengene sind zwei alternative Ansätze dargestellt: Die Identifizierung homologer Komponenten kann mit Hilfe des RNAi *in vivo* Systems erfolgen. Dabei deuten fluoreszierende Zellen auf eine Beteiligung am RNAi-Mechanismus hin. Eine Alternative für die Identifizierung weiterer Komponenten bietet die RNAi-library (vgl. Text und Abbildung 27). Nach der Identifizierung erfolgt der Nachweis, ob es sich bei dem Protein um eine Komponente des Initiations- oder des Effektorschrittes handelt (Klassifizierung). Dabei werden *knock down* oder *knock out* Mutanten des betreffenden Gens mit siRNA *si315* elektroporiert. Kommt es zu der Ausbildung eines FAT-Phänotyp, so ist der Effektorschritt funktionell. Folglich handelt es sich um eine Komponente des Initiationsschrittes. Andernfalls ist die Komponente essentiell für den Effektorschritt. Je nach Zuordnung können biochemische Analysen mit Hilfe des DIVAs (*Dicer in vitro* Assay) oder des RIVAs (*RISC in vitro* Assay) durchgeführt werden. Hierbei können Lysate von *knock out* Zellen verwendet werden, die Mutanten des Kandidatengens exprimieren.

T7-*in vitro* Transkription (vgl. Abbildung 18) reduziert werden. Falls es gelingen sollte, einfachere Transfektionsmethoden für siRNAs zu entwickeln, ist langfristig auch ein genomweites *screening* wie in *C. elegans* denkbar (132-135). So ist für Zellkulturen von *Drosophila* S2 Zellen oder *Plasmodium falciparum* (Malariaerreger) berichtet worden, dass RNAi durch die Applikation von synthetischer dsRNA in das Medium induziert werden konnte (136,137). Da *Trypanosoma brucei* als Erreger der Schlafkrankheit eine medizinische Relevanz besitzt, könnten genomweite RNAi-*screens* in Zukunft für die Erforschung von Medikamenten eingesetzt werden. Darüber hinaus ist auch der Einsatz synthetischer siRNAs *per se* als Therapeutikum gegen die Schlafkrankheit denkbar. Studien zeigen, dass Cholesterin-gekoppelte siRNAs nach ihrer intravenösen Applikation zu einem systemischen und sequenzspezifischen *silencing* in Mäusen führen (138). Eine Entwicklung von siRNAs, die spezifisch von der Trypanosomen Blutstromform aufgenommen werden und zum *silencing* essentieller Gene führt, könnte die Grundlage für neuartige Therapeutika gegen die Schlafkrankheit sein.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der biochemischen Charakterisierung des RNA *interference* Mechanismus' und der Entwicklung von Strategien zur Identifizierung von RNAi-Komponenten in *Trypanosoma brucei*. Es wurden zwei *in vitro* Assays etabliert, die sowohl den Initiations- als auch den Effektorschritt rekapitulieren. Die Assays ermöglichten die biochemische Charakterisierung der beiden Reaktionsschritte und die strukturelle Analyse von siRNAs als Intermediate des RNAi-Mechanismus'. Ergebnisse dieser strukturellen Analyse wurden verwendet, um die Transfektion synthetischer siRNAs in *Trypanosoma brucei* zu etablieren und Richtlinien zur Sequenzauswahl funktioneller siRNAs zu definieren. Darüber hinaus konnte ein *in vivo* System entwickelt werden, das den Nachweis essentieller RNAi-Komponenten mit Hilfe eines Reportersystems ermöglicht.

In dieser Arbeit ergaben sich folgende Ergebnisse:

1. Die biochemische Charakterisierung impliziert die Beteiligung konservierter Dicer-Domänen am RNAi-Initiationsschritt von *T. brucei*. Dabei weist die terminale Prozessierung des dsRNA-Substrates auf die Beteiligung einer PAZ-Domäne hin, während die Abhängigkeit der Reaktion von ATP konsistent mit einer Helikasefunktion ist. Strukturelle Eigenschaften der Reaktionsprodukte (siRNAs) sowie die Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen deuten auf eine RNaseIII-Aktivität im Initiationsschritt hin.
2. Strukturelle Analysen der siRNAs zeigen, dass diese in *T. brucei* eine konservierte Struktur im Vergleich zu prototypischen siRNAs aufweisen. Die Transfektion synthetischer α -Tubulin siRNAs resultiert in einem spezifischen *knock down* und dem dafür charakteristischen FAT-Phänotyp der Trypanosomenzellen. Vergleichende Sequenzanalysen von funktionellen und nicht-funktionellen siRNAs zeigen, dass die thermodynamische Stabilität besonders an den Termini einen Einfluss auf die *knock down* Effizienz hat. Funktionelle siRNAs besitzen eine höhere thermodynamische Stabilität am 5'-Ende im Vergleich zum 3'-Ende des *sense*-Stranges.
3. Die Charakterisierung des Effektorschrittes in *T. brucei* weist Eigenschaften einer RISC-katalysierten Reaktion auf. Dabei determinieren die siRNAs die Position der sequenzspezifischen Hydrolyse homologer

mRNAs. Darüber hinaus bestimmt die thermodynamische Stabilität der siRNA-Termini, ob die *sense*- oder *antisense*-mRNA hydrolysiert wird.

4. *Fluorescent Timer* ist ein detektierbarer und quantifizierbarer Reporter für RNAi in *Trypanosoma brucei*. Das Expressionsniveau dieses Reporters kann für das RNAi *in vivo* Systems als Nachweis sowie für die Identifizierung neuer RNAi-Komponenten eingesetzt werden.

Als Perspektive bildet die Etablierung der *in vitro* und *in vivo* Nachweissysteme die Grundlage für die Identifizierung und Charakterisierung neuer RNAi-Komponenten in *T. brucei*.